

# ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

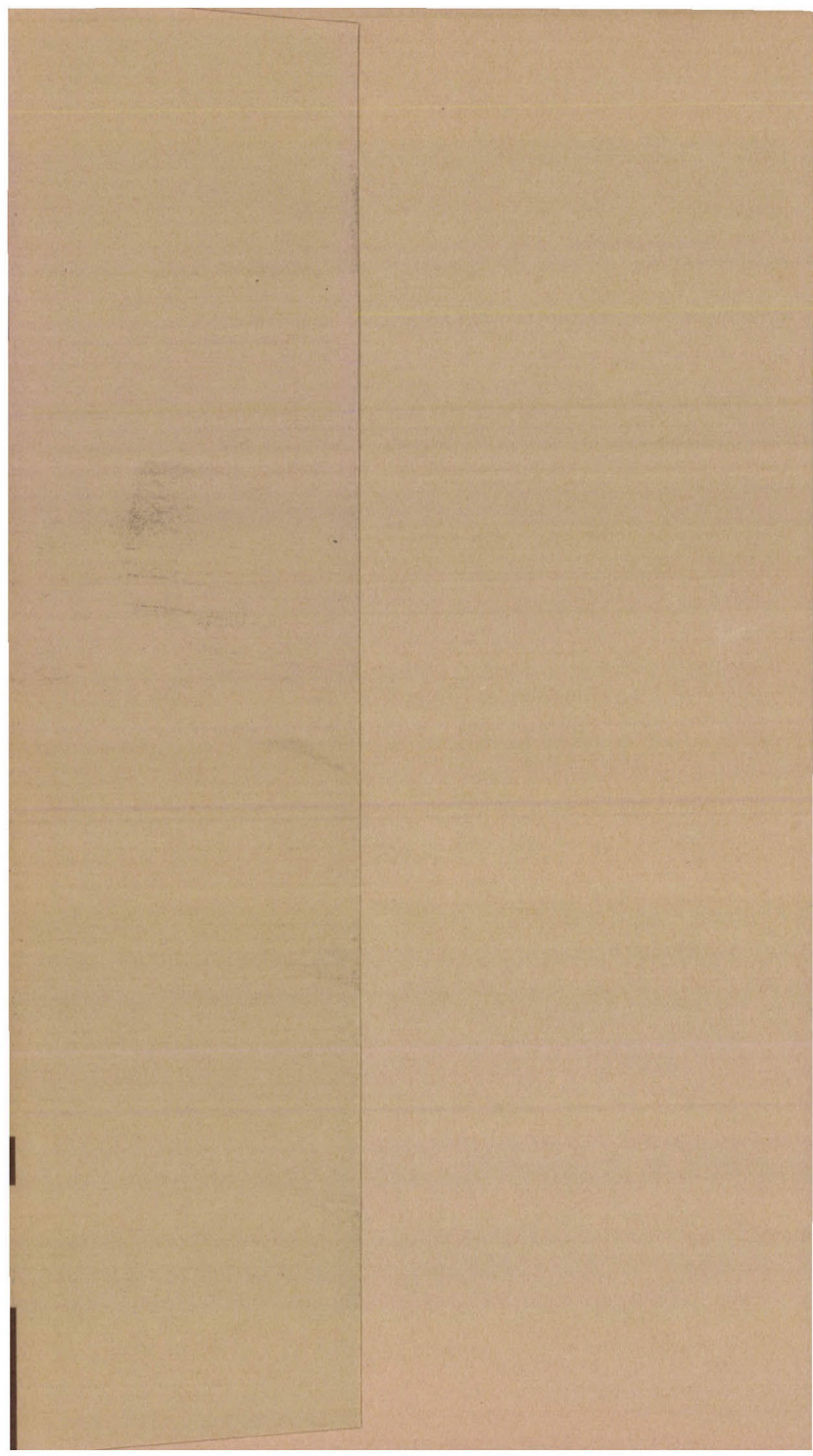
KESZTHELYI LAJOS

FEHÉRJÉK  
ÉS ELEKTROMOS  
JELENSÉGEK



37

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



ÉRTEKEZÉSEK  
EMLÉKEZÉSEK

# ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

SZERKESZTI  
TOLNAI MÁRTON



KESZTHELYI LAJOS

FEHÉRJÉK  
ÉS ELEKTROMOS  
JELENSÉGEK

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1983. MÁRCIUS 21.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982.  
évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes és  
levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak  
napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982.  
számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 3918 7

© Akadémiai Kiadó, Budapest 1985, Keszthelyi Lajos

Printed in Hungary

## 1. BEVEZETÉS

1791-ben LUIGI GALVANI beszámolt egy fontos észlelésről: a békacomb megrándul, ha rézhoroggal vaskerítésre akasztva az hozzáér a kerítéshez. A jelenségről GALVANI a következőket írta: „Az elektromosság magában az állatban székel, egy sejtés, amelyet az a megfigyelés is megerősített, hogy egyfajta szubtilis ideg fluidum (hasonló a leideni palack elektromos fluidumához) köti össze az ideget az izommal, amikor az összehúzódások létrejönnek” [1]. A megállapítás igaz ma is, csak a jelenségekről sokkal többet tudunk. Egy mai gimnazista elmondja, hogy két különböző fém és a békacomb mint elektrolit az érintkezés idején áramforrást alkot. (Ezt már VOLTA is így tudta, aki megépítette a galvánelemet.) Az áramlöket ingert jelent, az izom ennek hatására rándul össze. Az izom sejtjeinek a membránján elektromos potenciál mérhető, ez változik meg az elektromos inger hatására, amelynek következménye az izomrostok összehúzódása. Azt is tudják, hogy az izmot az élő testben idegeken érkező elektromos impulzusok ingerlik. Az idegsejtek és izomsejtek membránján egyaránt elektromos potenciál mérhető. Az idegeken érkező változás, az akciós potenciál speciális készüléken, a szinapszison át jut az izom membránjára. A szinapszison kémiai anyag megy az izom membránjára és ott megváltoztatja a membránpotenciált.

Az egyetemi hallgató tudja, hogy a membránpotenciált főleg  $\text{Na}^+$ - és  $\text{K}^+$ -ionok sejten belüli és a

külső folyadékban való egyenlőtlen eloszlás okozza. A koncentrációkülönbséget a sejtek energiafelhasználás révén hozzák létre. A membránpotenciál megváltozása, az akciós potenciál során  $\text{Na}^+$ -ionok áramolnak be a sejtbe, és  $\text{K}^+$ -ionok lépnek ki a sejtéből. Az eredeti koncentrációeloszlás azonban rövidesen helyreáll.

A frissen végző biológus hallgatók már azt is megtanulják, hogy a membránpotenciálnak nemcsak az idegi-izommozgási jelenségekben van szerepe, hanem a sejtek energiaháztartásában is. A fényenergia és a táplálék energiája két fő lépésben alakul át kémiai energiává. Az első lépésben az energia membránpotenciál és pH gradiens formájában jelenik meg a megfelelő átalakító egységekben (kloroplasztiszok, mitokondriumok stb.), amely a második lépésben ATP-molekulákat szintetizál.

Az elektromos jelenségeknek tehát döntő szerepük van a sejtek működésében. Elektromos potenciálok a membránokon jelennek meg. A membránpotenciál keltését, a változásokat, az ATP szintézist a membránhoz kötött *fehérjék* valósítják meg. Az még nem teljes mértékben tananyag, hanem kutatás tárgya, hogy a fehérjék hogyan működnek, melyek a molekuláris történések az élőlények elektromos jelenségeinek a létrehozásában.

A dolgozat ebben az értelemben foglalkozik a fehérjék és elektromos jelenségek témakörével, kirekesztve a tárgyalásból az atomok és molekulák alkotórészeinek összetartásában mélyen rejlő elektromágneses erőket.



## 2. A MEMBRÁNPOTENCIÁL KELTÉSE

A biológiai membránokon bizonyos ionok különböző mértékben hatolnak át, a membránok permeabilitása ionról ionra változik. Ennek következménye az, hogy a membránok által elválasztott belső és külső térben eltérő koncentrációk lehetnek, amelyek amelyek csak lassú diffúzió révén egyenlítődhetnek ki. A Nernst-egyenlet adja meg az adott X ionokra, amelyek belső koncentrációja  $[X]_b$  és külső koncentrációja  $[X]_k$ , a membránpotenciált:

$$\begin{aligned} V &= \frac{RT}{F} \ln \frac{[X]_b}{[X]_k} = 2,302 \times \frac{RT}{F} \log \frac{[X]_b}{[X]_k} = \\ &= 58 \log \frac{[X]_b}{[X]_k} \text{ mV,} \end{aligned} \quad (1)$$

ahol  $R$  a gázállandó,  $T$  a hőmérséklet K fokban és  $F$  a Faraday-állandó. (Az egyenletben  $T=293$  K.)

A koncentrációkülönbséget létre kell hozni, és fenn kell tartani az állandó veszteségek (működés és egyszerű áthaladás) ellenében. A feladathoz a sejtek energiát használnak, ATP-molekulákat, amelyek a sejtfaiba beépült speciális enzimekkel lépnek kölcsönhatásba. Az  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$  bomlásból (az ATP ún. hidrolíziséből) származó energia az enzimek segítségével ionokat juttat át a membránon. Általánosan elfogadott kifejezés az ionpumpa, mert energiával kisebb koncentrációjú térrészből nagyobb koncentrációjú térrészbe jutnak az ionok. Az 1. táblázatban felsorolunk néhány jól ismert ionpumpát, amelyek mind az ATP energiáját felhasz-



# 1. Táblázat

NÉHÁNY ISMERTEBB IONPUMPA ÉS JELLEMZŐI.  
b ÉS k ALSÓ INDEXEK BELSŐ, ILL. KÜLSŐ TÉRRÉSZT  
JELENTENEK. AZ ATP ÉS ADP Mg-HEZ KÖTVE  
HATÁSOS

Elnevezés	Reakció
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP-áz	2K <sub>k</sub> <sup>+</sup> + 3Na <sub>b</sub> <sup>+</sup> + MgADP <sub>b</sub> + + P <sub>ib</sub> + 3Na <sub>k</sub> <sup>+</sup> + 2K <sub>b</sub> <sup>+</sup>
Ca <sup>2+</sup> -ATP-áz	2Ca <sub>b</sub> <sup>2+</sup> + MgADP <sub>b</sub> + + P <sub>ib</sub> + 2Ca <sub>k</sub> <sup>2+</sup>
H <sup>+</sup> + K <sup>+</sup> -ATP-áz	4K <sub>k</sub> <sup>+</sup> + 4H <sub>b</sub> <sup>+</sup> + MgADP <sub>b</sub> + + P <sub>ib</sub> + 4K <sub>b</sub> <sup>+</sup> + 4H <sub>k</sub> <sup>+</sup>
ATP-áz } ATP-szintáz }	3H <sub>b</sub> <sup>+</sup> + MgADP <sub>b</sub> + + P <sub>ib</sub> + 3H <sub>k</sub> <sup>+</sup>

nálva pumpálják az ionokat [2]. A Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP-áz felelős a K<sup>+</sup>- és Na<sup>+</sup>-ionok koncentrációkülönbségének létrehozásáért. Egy ATP-molekula felbomlásából származó energia ellenében 3 Na<sup>+</sup>-iont szállít a sejtből kifelé és 2 K<sup>+</sup>-iont hoz be. A Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz Ca<sup>2+</sup>-ionokat szállít a sejtből kifelé, a H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>-ATP-áz H<sup>+</sup>- és K<sup>+</sup>-ionokat cserél.

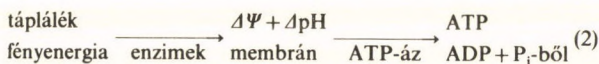
Az ATP-áz vagy ATP-szintáz az energiaátalakításban résztvevő protein, amely protonkoncentráció-különbség vagy elektromos tér hatására felszabaduló külső protonok hatására ATP-t szintetizál, vagy ATP hatására H<sup>+</sup>-ionokat pumpál a sejtből kifelé.

Jóllehet valamennyi reakció megfordítható, tehát elvben jóirányú nagy Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>-koncentráció-különbségek ATP-t szintetizálhatnak, az ATP

szintézis szempontjából mégis csak az ATP-áz molekuláknak van lényeges jelentősége. Az elektromos potenciálkülönbséget és pH grádienszt (jelölésben  $\Delta\Psi$  és  $\Delta\text{pH}$ ) a fény és a táplálék energiájából állítják elő egyes enzimrendszerek.

A mitokondriumok esetében a táplálék, pl. cukor energiáját különböző enzimek a  $\text{NAD}^+$ -molekulára átvitt  $\text{H}_2$ -molekula energiájává alakítják, majd a belső membránban lokalizált enzimek a  $\text{H}_2$  lassú  $\text{H}_2\text{O}$ -vá való elégetése közben protonokat juttatnak a belső térből a külső térbe. Ez töltésáthelyezést jelent, amely feltölti a membránt mint kondenzátort ( $\Delta\Psi$ ) és létrehozza a pH-különbséget ( $\Delta\text{pH}$ ). A kloroplasztiszokban az abszorbeált fotonok elektronokat indítanak el az elektrontranszport láncban, amelynek egyes lépéseiben protonok jutnak a belső térbe a külső térből.

Az ATP szintézis általános sémája tehát



Az energiaszintézis e modelljét MITCHELL javasolta 1962-ben [3], amely napjainkban már általánosan elfogadott [4].

A Mitchell-féle kemiozmózis elmélet fenomenológikus elmélet. Nem jelent egyértelmű ismereteket a molekuláris mechanizmusok szempontjából. Fontos és sokat vitatott kérdés például a protonok átjuttatásának módja. MITCHELL általános elvekre hivatkozva jósolja, hogy H-atomok mennek át a membránon a belső oldalon egyesülve egy elektron-

nal, amely a transzport láncban halad. A H-atomok a külső oldalon szétkapcsolódnak [5].

Sokasodnak azonban azok a vizsgálatok, amelyek bizonyítják, hogy a protonokat a transzport lánc enzimeji pumpálják. A legvilágosabb a bizonyítás a mitokondriális folyamatokban a citokrom c oxidáz [6], illetve egy eddig még nem említett kb. 10 éve felfedezett egyszerű fotoszintetizáló rendszer, a *Halobacterium halobium* [7] esetében, ahol egyetlen fehérjemolekula, a baktérium sejtfalába épült bakteriorodopszin pumpál protont fényenergia ellenében.

Az (1) és (2) egyenlet különbözik. Az (1) egyenletet  $V = \Delta pX$ -ként írhatjuk, ez olyan potenciál, amely akkor is létrejön, ha a membrán külső és belső oldala elektromosan semleges. A  $\Delta \Psi$  tag a (2) egyenletben a kompenzálatlan töltés áthelyezés eredménye.

Tekintsük át a membránba épülő fehérjéket, amelyekről biztosan tudjuk, hogy a sejtek elektromos jelenségeiben részt vesznek. A 2. táblázatban a fehérjék jellegzetes funkciója szerinti többé-kevésbé önkényes csoportosítását kíséreljük meg. Az egyik csoport energia hatására membránpotenciált hoz létre, tehát munkát végez, a másik csoport a membránpotenciál hatására ATP-t szintetizál, vagy csatornát nyit, tehát a felhalmozott energiát fogyasztja.

Nagyon sok sejt membránjában különböző ionokat átengedő „csatornák” is vannak, amelyeket a membránpotenciál időleges megváltozása nyit ki. Nyitott állapotban nagy specifitással csak  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok hatolnak át rajtuk. Ismereteink



## 2. Táblázat

### A MEMBRÁNHOZ KÖTÖTT, ELEKTROMOS JELENSÉGEK BEN SZEREPE T JÁTSZÓ FEHÉRJÉK JELLEGZETES FUNKCIÓ SZERINT TÖRTÉNŐ CSOPORTOSÍTÁSA

Membránpotenciált létrehozó fehérjék	Fehérjék, amelyek a membránpotenciál hatására munkát végeznek
Ionpumpák: Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP-áz, Ca <sup>2+</sup> -ATP-áz K <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> -ATP-áz	ATP szintetizáló fehérjék: ATP-szintáz  Csatornák: Na <sup>+</sup> -csatornák K <sup>+</sup> -csatornák Ca <sup>+</sup> -csatornák
Protonpumpák: Cyt C oxidáz Bakteriorodopszin	

szerint az elektromos tér hatására nyíló vagy záródó csatornák is membránokba rögzített fehérjék.

Az „elektromos” fehérjéknek van közös tulajdonságuk is. A fehérjék működésük közben töltéseket mozgatnak valamilyen ellenállással szemben, amelyet barrierékkel lehet leírni. A barrierék magasságát a felépített membránpotenciál változtatja, hozzáad, akkor a reakció lassabb lesz, vagy levon, akkor a reakció gyorsabb lesz. Egyenletben:

$$k = Ae^{-\frac{\Delta H \pm \alpha eV}{k_B T}}, \quad (3)$$

ahol  $k$  a reakció sebességállandója ( $s^{-1}$ ),  $A$  egy állandó,  $\Delta H$  az aktivációs entalpia,  $\alpha V$  a membránpotenciál hatékony része,  $e$  a töltés,  $k_B$  a Boltzman-állandó,  $T$  a hőmérséklet K-fokban.

A molekuláris történéseket a *H. halobium*-ban talált bakteriorodopszin molekulákban sikerült legjobban megérteni, ezért a következőkben főleg a bR molekulákra koncentrálnunk.

### 3. A bR FOTOCIKLUSA

A bR abszorbeál egy fotont, amelynek hatására a molekulában időben egymás után különböző változások történnek. A változásokat más-más fizikai módszerrel tanulmányozva azt tapasztaljuk, hogy — szobahőmérsékleten — mintegy 10 ms idő telik el, amíg a molekula a kiinduló állapotba visszatér, és eközben a foton energiáját arra használja fel, hogy egy, vagy több — vitatott — protont áthelyezzen a molekula egyik oldaláról a másikra. A 10 ms alatti történések összessége a fotociklus. Áttekintjük — némi kritikával — a fotociklusra vonatkozó ismereteinket.

#### 3.1. A bR szerkezete

Ismeretes a bR aminosav szekvenciája [9, 10]. Eszerint 247 aminosavat tartalmaz, molekulatömege 26534. Térszerkezete csak 7 Å-ös felbontásban ismert [8], eszerint 7 helix szeli át sorban egymás után a membránt. A belső oldalon hosszabb aminosavlánc (17 darab) lóg ki (ez a fehérje karboxil vége). A 216. aminosav lizin, ehhez kötődik a retinál-molekula, amely a fotonokat abszorbeálja. A lizin—retinál kötés, az ún. Schiff-bázis a belső oldalhoz van

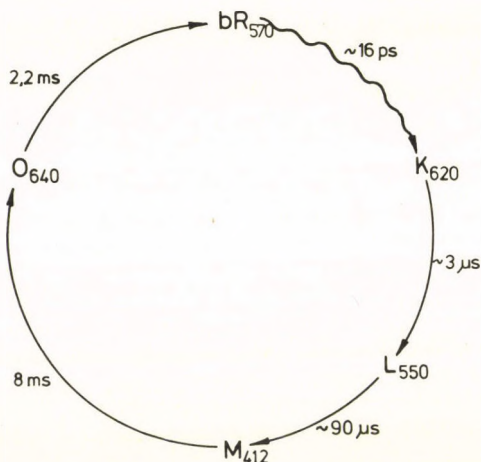


közelebb, mintegy egyharmad membrán vastagságban. A Schiff-bázison alapállapotban egy proton található, amely a fotociklus során onnan elmozdul, a Schiff-bázis deprotonálódik, és az alapállapotba való visszatéréskor reprotonálódik [11].

A retinál a membrán síkjával mindegy  $70^\circ$ -os szöget zár be [12], a lánc végén levő gyűrű a membrán közepében található [13]. A bR alapállapotában a retinál all-transz és 13-cisz izomer formájában fordul elő. A két forma sötétben egyensúlyban van, megvilágítással a 13-cisz-izomer all-transz állapotba hajtható. A sötét formát DA (dark-adapted), az all-transz formát LA (light adapted) formának nevezzük. Az LA forma szobahőmérsékleten sötétben 30 perc életidővel alakul vissza DA formává [7]. Protonpumpálással együttjáró fotociklus csak az all-transz bR-ban van.

### 3.2. A bR fotociklusának megnyilvánulásai a látható spektrum tartományban

A bR-molekulák *H. halobium* sejtek plazmamembránjában  $\simeq 500$  nm átmérőjű szigetekbe koncentrálnak, amelyek elhelyezkednek el, amelyeket szeparálni lehet és oldatban tárolhatók. A membrándarabokat bíbormembránoknak (purple membrane, pm) nevezzük. A bR molekulák a pm-ben szabályos 6-szög rácspontokon helyezkednek el. A pontok 6,3 nm távolságban vannak egymástól, egy-egy pontban 3 bR molekula helyezkedik el szabályos háromszögben. A pm-eken a bR-molekulák — megfelelő



**1. ábra.** A bR fotociklusa. K, L, M, O a különböző formák, intermedierek, amelyeket abszorpciós spektrumok maximális hullámhossza és élettartamuk (szobahőmérsékleten) jellemez

tárolás esetén — hosszú ideig megőrzik aktivitásukat.

A bR fotociklusát többnyire a pm-ek vizes szuszpenziójában tanulmányozzák. A fotociklus jellemzésére a látható spektrumtartományban egymás után különböző időállandókkal megjelenő abszorpciós maximummal rendelkező formákat használjuk.

Az 1. ábrán bemutatjuk az egyszerű fotociklus modellt, amelyet már 1975-ben javasoltak [14], és amelynél lényegesen jobbat 1982-ben sem sikerült találni [15]. A modell egyszerű, elágazás mentes, az állapotok sorban egymás után következnek. Minden egyéb elképzelést: különböző eljárásokat, egyensúlyok kialakulását erre a modellre vonatkoztatják.

A modell lényege: a  $bR$  alapállapotban abszorbeál egy fotont, amely a rendszert nagyon rövid idő alatt a  $K$  állapotba hajtja. Innen termikus gerjesztés révén halad a ciklus előre, közben a Schiff-bázis protonja átjut a távolabbi oldalra, majd belülről reprotonálódik. Az 1. ábra a protonemissziót az  $M$  állapot bomlásához, felvételt az  $O$  állapot bomlásához rögzíti. A kérdés vitatott, saját vizsgálataink alapján részletesen tárgyaljuk.

Az egyszerű lineáris reakcióláncot a radioaktív bomlássorozatok tanulmányozására kidolgozott ún. Batemann-függvények segítségével írhatjuk le. Ha  $t=0$  időpontban  $N_{00}$  molekulából  $N_1$  molekulát gerjesztenek a fotonok pillanatszerűen és ezek  $k_1, k_2, \dots, k_i, \dots, k_n$  sebességi állandókkal bomlanak egymás után, akkor az  $i$ -edik állapotban a molekulák számának időfüggése:

$$i=1 \quad N_1(t) = N_1 e^{-k_1 t} \quad (4)$$

$$i=2, 3, \dots, n \quad N_i(t) = N_1 k_1 k_2 \dots k_{i-1} \sum_{v=1}^i \frac{e^{-k_v t}}{a_{vi}} \quad (5)$$

és minthogy az  $n$ -edik állapot bomlása visszaállítja az alapállapotot a kiindulási állapot visszaállásának időfüggése:

$$N_0(t) = N_{00} - N_1 k_1 k_2 \dots k_n \sum_{v=1}^n \frac{e^{-k_v t}}{k_v a_{vn}}, \quad (6)$$

az (5) és (6) egyenletben

$$a_{vi} = (k_1 - k_v)(k_2 - k_v) \dots (k_{v-1} - k_v)(k_{v+1} - k_v) \dots (k_i - k_v) = \prod_{\substack{j=1 \\ j \neq v}}^i (k_j - k_v). \quad (7)$$



Az egyes bR formák populációját szigorúan véve a fenti egyenletek írják le. Nagyon szerencsés azonban a bR fotociklusában, hogy a  $k_i$  állandók ( $k_i = \frac{1}{\tau_i}$ ,  $\tau_i$ -k az 1. ábrán láthatók az egyes formákra) nagyon különböznek egymástól, ezért az egyes formák populációjának leírásához többnyire elegendő az (5) egyenlet két tagja. Ekkor az első forma populációját adja a (4)-es egyenlet, a másodikét pedig:

$$N_2(t) = N_1 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}). \quad (8)$$

$N_2(t)$  maximummal rendelkező görbe,

$$t_{\max} = \frac{1}{k_2 - k_1} \ln \frac{k_2}{k_1}, \quad (9)$$

$$N_{2\max} = N_1 \left( \frac{k_1}{k_2} \right)^{\frac{k_2}{k_2 - k_1}}. \quad (10)$$

A (8) kifejezés jól leírja a  $K \rightarrow L$  átmenet során az  $L$  populációt, mert a  $bR \rightarrow K$  átmenet nagyon gyors; az  $L \rightarrow M$  átmenet után az  $M$ -populációhoz a (4) egyenlet is megfelel, az  $M \rightarrow O$  átmenet után az  $O$  molekulák számának időfüggésére szintén megfelelő a (8) egyenlettel való közelítés, mert az  $M$ -et tápláló  $L$  bomlás az  $M$  és  $O$  bomláshoz képest nagyon gyors.

Az előbbieken feltettük, hogy az  $N_{00}$  darab bR molekulából a fotonok a bomlásidőkhöz képest rövid idő alatt gerjesztenek  $N_1$  molekulát. Ehhez lézerpulzus vagy rövid felvillanást adó flash lámpa szükséges. Ha folytonos fénnel világítjuk meg a bR molekulákat, akkor más egyenletek

kellenek. A gerjesztett molekulák a fotocikluson végighaladva újra alapállapotba jutnak és újra gerjeszthetők. Egyensúly alakul ki az alapállapotban és a különböző formákban levő molekulák között. A differenciálegyenleteket egyszerű megoldani egyetlen közbenső állapotra (a leghosszabb bomlási idejű  $M$  állapotot tekinthetjük ennek). Az alapállapot ( $N_0$ ) és gerjesztett állapot  $N_1$  molekulaszámának változása:

$$\frac{dN_0}{dt} = \dot{N}_0 = -(N_{00} - N_1)\sigma\phi + k_1N_1 \quad (11a)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = \dot{N}_1 = (N_{00} - N_1)\sigma\phi - k_1N_1. \quad (11b)$$

Itt  $\sigma$  a ciklus gerjesztésének hatáskeresztmetszete,  $\phi$  a gerjesztő fotonfluxus.  $t=0$  időben a molekulák száma  $N_{00}$ , akkor az egyenletek megoldása:

$$N_0(t) = N_{00} \frac{k_1}{\sigma\phi + k_1} \left( 1 + \frac{\sigma\phi}{k_1} e^{-(\sigma\phi + k_1)t} \right) \quad (12a)$$

$$N_1(t) = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi + k_1} (1 - e^{-(\sigma\phi + k_1)t}). \quad (12b)$$

$N_1(t)$  a növekedés sebességi állandója nagyobb  $k_1$ -nél, a bomlás sebességi állandójánál. A telítési érték  $\phi$ -től függ, és az összes molekulát csak  $\phi \gg k_1$  esetén gerjeszthetjük. A fény kikapcsolásakor  $N_0$  és  $N_1$  a  $k_1$  sebességi állandóval éri el az  $N_{00}$ , illetve 0 értéket.

Nagyon fontos figyelembe venni a (11b) differenciálegyenletet olyan esetekben, amikor állandó megvilágítással a molekulák egy részét gerjesztett állapotba visszük és ilyen helyzetben tanulmányoz-



zuk az 1-es állapot bomlását, pillanatszerű gerjesztés után. A telítési gerjesztés  $\bar{N}_1 = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi + k_1}$ , a pillanatszerű gerjesztés  $N_{1g}$  molekulát gerjeszt a  $t = t_0$  időben. Akkor (11b) egyenletből:

$$N_1(t) = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi + k_1} N_{1g} e^{-(\sigma\phi + k_1)(t - t_0)}, \quad (13)$$

azaz a látszólagos sebességi állandó ebben az esetben is megnő. Sokkal bonyolultabb egyenletekre jutunk, ha a (11) egyenletekhez még egy komponenst ( $N_2$ ;  $k_2$ ) és még egy differenciálegyenletet írunk. A megoldás (ha  $t = 0$  időben  $N_0 = N_{00}$ ,  $N_1 = 0$ ,  $N_2 = 0$ ):

$$N_1(t) = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi \left(1 + \frac{k_1}{k_2}\right) + k_1} \times \\ \times \left\{ 1 + \frac{1}{k_2(\mu_1 - \mu_2)} [(\mu_1 + k_2)\mu_2 e^{\mu_1 t} - (\mu_2 + k_2)\mu_1 e^{\mu_2 t}] \right\} \quad (14a)$$

$$N_2(t) = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi \left(1 + \frac{k_2}{k_1}\right) k_2} \times \\ \times \left\{ 1 + \frac{1}{\mu_1 - \mu_2} [\mu_2 e^{\mu_1 t} - \mu_1 e^{\mu_2 t}] \right\}, \quad (14b)$$

ahol

$$\mu_{1,2} = \frac{-(k_1 + k_2 + \sigma\phi) \pm \sqrt{(k_1 + k_2 + \sigma\phi)^2 - 4k_1 k_2 + (k_1 + k_2)\sigma\phi}}{2}. \quad (15)$$

A két sebességi állandót tartalmazó (14, 15) egyenletekre azonban ritkán van szükség.

Az 1. ábrán látható egyszerű lineáris modelltől való eltéréseket általában olyan vizsgálatok alapján javasolják különböző szerzők [17, 18, 19], amelyeket extrém körülmények között végeztek, pl. alacsony hőmérsékleten, nagy vagy kicsi pH-n, extra sókoncentrációban. A különböző állapotok bomlási görbéjéhez 2 exponenciális komponenst lehetett csak illeszteni, amely a szerzők szerint két  $K$ , két  $L$ , két  $M$  formára utal. Nem sikerült azonban a két  $M$  formát spektrális alapon megkülönböztetni.

Rá kell mutatnunk arra, hogy bomlási görbe exponenciálistól való eltérését másképpen is lehet értelmezni. Ismeretes, hogy a nagy molekulatömegű fehérjék egyes atomjai egyensúlyi helyzetük körül különböző amplitúdóval rezeghetnek [20, 21]. A molekula ilyen módon pillanatról pillanatra változik, igaz csak kismértékben. Az egyes molekulák energiaállapota, és ebből következően az átmenetek aktivációs szabadentalpiája is különböző lehet. A jól ismert Arrhenius-egyenlet szerint az elsőrendű reakciók bomlási állandója

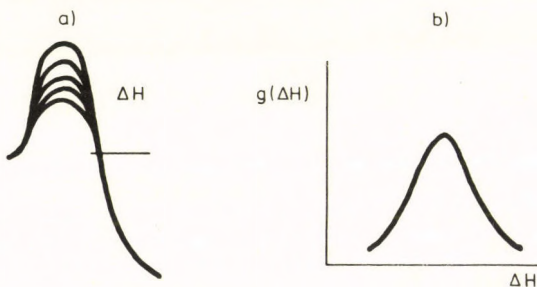
$$k = Ae^{-\frac{\Delta H^*}{k_B T}}, \quad (16)$$

ahol  $A$  az ún. frekvencia faktor, értéke a reakciók „átmeneti állapot” elmélete [22] alapján  $10^{13} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta H^*$  pedig a reakció átmeneti szabadentalpiája,

$$\Delta H^* = \Delta S T - \Delta H. \quad (17)$$

$\Delta S$  az aktivációs entrópia,  $\Delta H$  az aktivációs entalpia értéke. A (16) egyenletet tehát

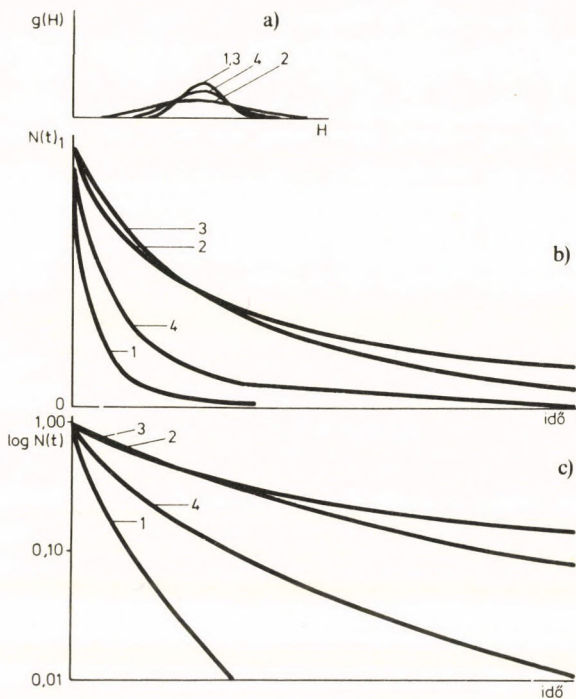
$$k = Ae^{\frac{\Delta S}{k_B}} \cdot e^{-\frac{\Delta H}{k_B T}} = A' e^{-\frac{\Delta H}{k_B T}} \quad (18)$$



**2. ábra.** Az aktivációs entalpia ( $\Delta H$ ) fehérjemolekulában nem pontosan meghatározott érték. *a)* aktivációs entalpia reakciókoordinátás ábrázolásban, *b)* az aktivációs entalpia eloszlását leíró  $g(\Delta H)$  függvény lehetséges alakja

formában írhatjuk. Az aktivációs entrópia változást  $A'/A$  értékéből határozhatjuk meg. A bR fotociklusára vonatkozó értékeket a különböző formák bomlása esetében a [23] dolgozat tartalmazza.

Az egyszerűség kedvéért tegyük fel, hogy a fehérjemolekulák fluktuációja csak az aktivációs entalpiára hat [20]. Ezt ábrázolja a 2. ábra: az aktivációs entalpia értékek egy középérték körül folytonos eloszlásban vannak, tehát  $k$  sok értéket vehet fel. Nagyobb hőmérsékleten az egyes konformációk gyorsan változnak, tehát  $k$  átlagértékét lehet csak mérni. Kisebb hőmérsékleten és különleges állapotokban a konformációk rögzülhetnek, az eredmény az exponenciálistól eltérő bomlási görbe lesz, amelyhez két, esetleg három exponenciálist lehet illeszteni a hibahatáron belül. A valóság azonban az, hogy a görbe nagyon sok exponenciális összege. A molekulák számának időbeli változását a



**3. ábra.** Polikromatikus reakciók szimulálása: a)  $g(\Delta H)$  függvény, b) a számított  $N(t)$  függvény, c)  $\ln N(t)$ , amelyhez látható módon két exponenciális komponens illeszthető. Paraméterek  $A = 2 \times 10^{17}$ ,  $\Delta H_0 = 860$  mV,  $\sigma_{1,3} = 15$  mV,  $\sigma_2 = 30$  mV,  $\sigma_4 = 20$  mV.  $T = 300$  °K,  $N_{00} = 1$

$\Delta H$  érték eloszlása esetén a következő függvény adja meg:

$$N(t) = N_{00} \int_0^{\infty} g(\Delta H) e^{-(A e^{-\Delta H/k_B T})t} d(\Delta H). \quad (19)$$

A mért  $N(t)$  függvényből a  $g(\Delta H)$  eloszlást kell ilyenkor meghatározni. Ez csak számítógéppel lehetséges. A 3. ábrán bemutatjuk a fordított esetet.



Feltesszük, hogy  $g(\Delta H)$  Gauss-függvénnyel írható le, azaz

$$g(\Delta H) = \frac{1}{\sqrt{\pi} \sigma_H} e^{-\frac{(\Delta H - \Delta H_0)^2}{\sigma_H^2}} \quad (20)$$

ahol  $\sigma_H$  a Gauss-görbe félértékszélessége. Látjuk, hogy  $\sigma_H/\Delta H \simeq 2\%$  esetén  $N(t)$  már jelentősen eltér az exponenciálisból és jól közelíthető két exponenciális komponenssel. Valódi mérési görbénél az illesztés még jobbnak is tűnik a pontok szórása miatt.

Azokat a reakciókat, amelyekben az aktivációs entalpia folytonos eloszlást mutat, találó névvel polikromatikus reakcióknak nevezzük [24]. Feltehetjük, hogy a bR-molekuláknál kis hőmérsékleten (+5—20 °C), vagy extrém pH és sókoncentráció esetén már befagyhatnak a konformációs állapotok, aminek a következménye a polikromatikus reakcióra valló bomláskép. A két vagy esetleg három, abszorpciós spektrumban nem, de időállandóan különböző L vagy M forma a fentiek alapján egyre redukálódik. Értelmezni tudjuk a [17] dolgozatban alacsony hőmérsékletre (−20 °C) közölt több komponens és a hőmérséklet, hullámhossz, idő függvényében felvett adatok egyszerű lineáris modellel való leírásának bizonyos nehézségeit [15].

Sajnos a (19) egyenlet nagyon bonyolult összefüggésekre vezet, ha a reakciósort kívánjuk oly módon leírni, ahogy azt a (4, 5) egyenletben tettük egyszerű exponenciális bomlások esetén. Úgy véljük azonban, hogy bR esetében a nagy bomlási állandó különbségek következtében lehetőség van az egyes



formák bomlásának analizálására a polikromatikus összefüggés (19) alapján. Minthogy elképzelhető, hogy a két párhuzamos forma abszorpciós spektruma nem, csak élettartama különbözik, a polikromatikus reakció vagy két forma közt döntenem nem lehet egyszerű bomlászörbe és spektrumanalízis alapján. A bomlási görbe hőmérsékletfüggésének mérése segíthet. A két külön forma esetén mindkét komponens sebességi állandójának külön-külön követni kell a (16) Arrhenius-egyenletet, és  $\Delta H$ -nak és  $\Delta S$ -nek is különbözni kell. Polikromatikus reakció esetében  $g(\Delta H)$  függvénynek első közelítésben nem szabad függeni a hőmérséklettől. Ilyen vizsgálatokat még senki sem végzett bR-molekulák esetében.

A mioglobín fehérjemolekulák vizsgálatakor a polikromatikus bomlászörbe lényegesen alacsonyabb hőmérsékleten ( $-70 - 80^\circ\text{C}$ ) jelentkezett, mint a bR esetében. A kétféle molekula között azonban lényeges különbséget várunk, mert a bR-molekula a nagy viszkozitású, tehát szabad fluktuációkat jóval erősebben korlátozó membrán anyagban működik, míg a mioglobín vízben oldódó fehérje.

Felmerül a kérdés, vajon a nagy viszkozitású membránok nem korlátozzák-e a membránokba ágyazott fehérjék szabad fluktuációját, azaz a polikromatikus kinetika nem lényegesen gyakoribb-e membránhoz kötött fehérjék esetében. Néhány ismert membránfolyamat kinetikáját megvizsgálva legalábbis gyanakodhatunk. LAVOREL mutatott rá a késleltetett fluoreszcencia polikromatikus jellegére [25], a fotoszintézisben az elektrokrom jelek általa-

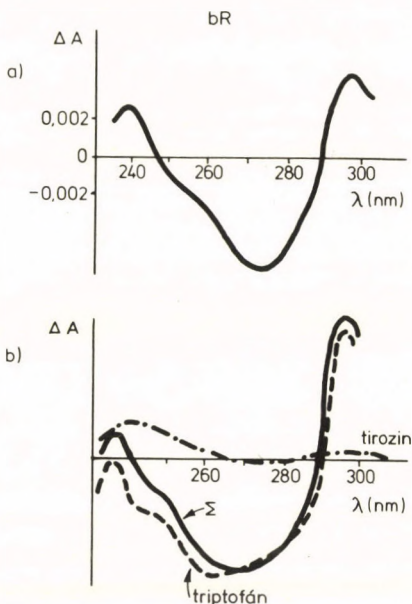
ban eltérnek az exponenciálistól [26], és a  $\text{Na}^+$  csatornák nyitásával—zárásával együttjáró kapuáramok is több exponenciálisra bonthatók [27].

### 3.3. *A bR fotociklusa az UV spektrumtartományban*

Több vizsgálat mutatja, hogy a fotociklus az UV spektrumtartományban is követhető [28, 29, 30, 31]. A 4. ábrán bemutatjuk azt, hogy 230—300 nm hullámhossztartományban hogyan változik az abszorpció maximális értéke és hogyan értelmezhetjük az egyes csúcsokat [32]. Az abszorpcióváltozás időfüggését leíró görbék bomlási ideje megegyezik az M forma bomlási idejével minden hullámhosszon [30, 31, 32], az emelkedési idő azonban különbözik, a triptofánra jellemző sáv abszorpciója  $K' \rightarrow K$  és a  $K \rightarrow L$  átmenet (a  $K'$  állapotról később szólunk), a tirozinra jellemző abszorpció pedig az  $L \rightarrow M$  átmenet időállandójával emelkedik [30].

### 3.4. *A bR fotociklusa és az infravörös és rezonancia Raman-spektrumok*

Az infravörös és rezonancia Raman-spektrumok a bR-molekula vibrációs állapotairól adnak számot. Különlegesen fontos a rezonancia Raman-spektroszkópia, mert a bR abszorpciós sávjában gerjesztve azokat a vibrációs átmeneteket lehet csak megfigyelni, amelyek a retinálhoz és környezetének



**4. ábra.** A bR fény gerjesztett UV abszorpció változásának és tirozin és triptofán differencia spektrumok összehasonlítása. Az abszorpcióváltozások a fényimpulzus után  $\sim 0,5$  ms-nél mért értékek; a) a differencia spektrumokat, b) az oldószer pH-jának két értéke között mértük: tirozin pH 13—pH6, triptofán pH 10,3—pH 1,2

változásaihoz tartoznak. Az ily módon meghatározott vibrációk további tanulmányozásához nyújt fontos hozzájárulást az infravörös spektroszkópia. A fontosabb megállapítások:

1. A retinál—lizin kapcsolatot jelentő Schiff-bázis protonált a bR alapállapotában és biztosan deprotonált az *M* állapotban [33, 34].



2. A proton pumpáló all-*transz*-izomer 13-*cisz*-izomer állapotban van a *K* formában. A fotonabszorpció hatása tehát izomerizáció, amely mechanikus mozgást jelent [34, 35].

3. Az *M* állapotban egy aminosav  $\text{COO}^-$ -csoportja protonálódik [36].

#### 4. A bR ÉS ELEKTROMOS JELENSÉGEK

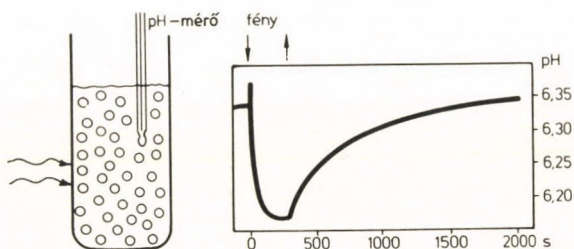
A fotociklust — amint látjuk — különböző módszerekkel megfigyelhető eseménysorozat jellemzi. A jelenségeket fontos történések külső megnyilvánulásainak tekinthetjük. A fontos történések — a következők: a foton abszorpciója; az energia átalakítása és stabilizálása a bR-molekulán belül; a proton átpumpálása, azaz kilépése a membrán külső oldalán és felvétele a membrán belső oldalán. A fehérje szerkezet biztosítja, hogy tetszőleges irányból érkező és abszorbeált elektromágneses sugárzás — a foton — egyirányú protonmozgást indukál.

A molekula abszorpciós spektruma a retinál és a fehérje kölcsönhatásának eredménye. Az abszorpciós sáv maximuma 570 nm-nél van, a dekadikus moláris extinkciós koefficiens 63 000 l/mol cm, amely megfelel  $\sigma = 2,41 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$  hatáskeresztmetszetnek. Az 570 nm hullámhosszú foton abszorpciója 0,35 aJ energia abszorpcióját jelenti. Nem minden abszorbeált foton indítja el a fotociklust, a kvantumhatásfok a mérések szerint  $\phi_c = 0,3$  [37].



#### 4.1. A bR mint protonpumpa

A *Halobacterium halobium* membránjában lokalizált bR-molekulák protonpumpáló sajátosságát OESTERHELT és STOECKENIUS ismerték fel 1973-ban [38]. A sejtek szuszpenzióját megvilágítva, a szuszpenzióba helyezett pH-elektród pH-csökkenést, azaz protonkoncentráció-növekedést jelzett (5. ábra). A megvilágítás kikapcsolása után az eredeti pH állt vissza. További vizsgálatok bebizonyították azt is, hogy a megvilágítás hatására — rossz hatásokkal ugyan — de ATP is keletkezik [39]. A membránpotenciál keletkezését SKULACHEV és munkatársai kísérletei igazolták [40]. A Mitchell-elmélet szempontjából különlegesen fontos volt az a kísérlet, amelyben ATP-áz és bR-molekulákat tartalmazó vezikulákat megvilágítva ATP-t szintetizáltak [41]. (A bR-ekből felszabadított protonok az ATP-áz molekulákat gerjesztették ATP szintézisre.)



**5. ábra.** *H. halobium* sejteket megvilágítva a pH csökken, vagyis a protonkoncentráció növekedik. A fény kikapcsolása után az eredeti pH áll vissza

A protonpumpa tulajdonságaival kapcsolatban két fontos kérdés merül fel: *a)* mi a jelenség stöchiometriája, azaz fotociklusonként hány proton  $\phi_{H^+}$  pumpál a bR? *b)* a protonpumpa időzítése, vagyis a fotociklus egyes lépései és a protonok emissziója és újrafelvétele között mi az időbeli kapcsolat?

A két kérdésre, annak ellenére, hogy nagyon sok vizsgálat foglalkozott vele ([42] és az ott idézett munkák) nincs elfogadható válasz. A következőkben a szükséges — egyszerű — elméleti háttérrel mutatjuk be, amelynek figyelmen kívül hagyása — véleményünk szerint — sok ellentmondás forrása.

A protonok megjelenését zárt sejtek és pm-ek szuszpenziójában mérik. Ha időzítést is kell mérni, akkor pH-érzékeny festékeket használnak, amelyeket a szuszpenzió pH-jának változtatásával kalibrálnak, a többé-kevésbé statikus mérésekhez a lassú pH-elektrodok is alkalmazhatók. Az időzítésméréseknél a gerjesztés lézerimpulzusokkal, az egyéb méréseknél folyamatos megvilágítással történik. A kétféle méréshez különböző egyenleteket kell felhasználni, ahogy arról már a 3.2. részben számot adtunk.

#### *4.1.1. Protonemisszió-mérés egy ciklus gerjesztéssel (flash megvilágítás)*

Legyen a protonok emissziójának sebességi állandója  $k_e$  és visszavételének  $k_v$ , továbbá a fényimpulzus gerjesszen  $N$  fotociklust. Akkor a protonok számának időbeli változását a (8) egyenlet alapján az

$$N_p(t) = \phi_H + N \frac{k_e}{k_v - k_e} (e^{-k_e t} - e^{-k_v t}) \quad (21)$$

egyenlet írja le.  $N$ -et, a gerjesztett fotociklusok számát, pl. az  $M$  állapotok számának abszorpciós méréséből lehet meghatározni,  $k_e$  és  $k_v$  a mért görbe időfüggéséből számítható.

$N_p(t)$  az idő függvényében maximumot ér el, amelyet a (9), illetve (10) egyenlet segítségével jellemezhetünk.

$$t_{\max} = \frac{1}{k_v - k_e} \ln \frac{k_v}{k_e}, \quad (22)$$

$$N_p(\max) = \phi_H + N \left[ \frac{k_e}{k_v} \right]^{\frac{k_v}{k_v - k_e}}. \quad (23)$$

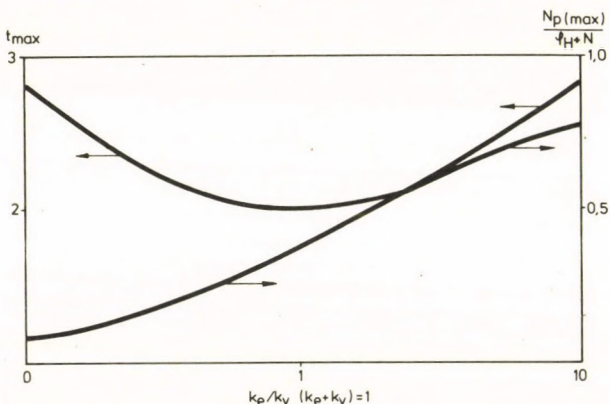
Ha  $k_e = k_v = k$ , akkor

$$N_p(t) = \phi_H + N k^2 t e^{-kt},$$

$$t_{\max} = \frac{1}{k}, \quad N_p(\max) = \phi_H + N \frac{k}{e}. \quad (24)$$

A 6. ábrán bemutatjuk  $t_{\max}$  és  $N_p(\max)/(\phi_H + N)$  függését a  $k_e/k_v$  paramétertől. Látható, hogy  $t_{\max}$  szimmetrikus függvény (6. ábra), ami azt jelenti, hogy az időfüggés vizsgálatából nem lehet eldönteni, hogy a görbeillesztés alapján meghatározott időállandókból melyik a protonemisszió, illetve -visszavétel időállandója. Márpedig az  $N_p(\max)/(\phi_H + N)$  függvény ettől nem szimmetrikusan függ. A 6. ábra mutatja, hogy  $\phi_H$  értékét döntő módon befolyásolja a két sebességi állandó sorrendje.

Az eddig elvégzett vizsgálatokban [43, 44, 45] a fenti egyenleteket egyáltalán nem vették figyelembe



6. ábra.  $t_{\max}$  és  $N_{p\max}/\phi_H + N$  (lásd 22—24 egyenletek) függése  $k_e/k_v$  aránytól. Mellékfeltétel  $k_e + k_v = 1$

$N_p(t)$  meghatározásakor. A kiértékelés úgy történt, hogy először  $N$ -et, a fotociklusok számát határozták meg az  $M$  állapot koncentrációjának mérésével. Legyen a  $bR$ -koncentráció alapállapotban  $c$ , az  $M$  állapotban  $nc$ , akkor

$$I_1 = I_0 10^{-\varepsilon_{bR}^{410} c x}, \quad (25)$$

ahol  $I_0$  a  $\lambda = 410$  nm fény intenzitása minta nélkül,  $I_1$  az  $x$  vastagságú minta után, amelynek dekadikus moláris extinkciós együtthatója ezen a hullámhosszon  $\varepsilon_{bR}^{410} = 1,5 \times 10^4$  l/molcm. Gerjesztés után a fényintenzitás lecsökken az  $M$  forma megjelenése következtében, majd az  $M$  forma életidejével visszaáll az  $I_1$  érték. A minimális fényintenzitásból ( $I_2$ ) szokás az  $M$  állapot koncentrációját meghatározni



$$I_2 = I_0 10^{-[e_{\text{BR}}^{(410)}(1-n) + \varepsilon_M n]cx}, \quad (26)$$

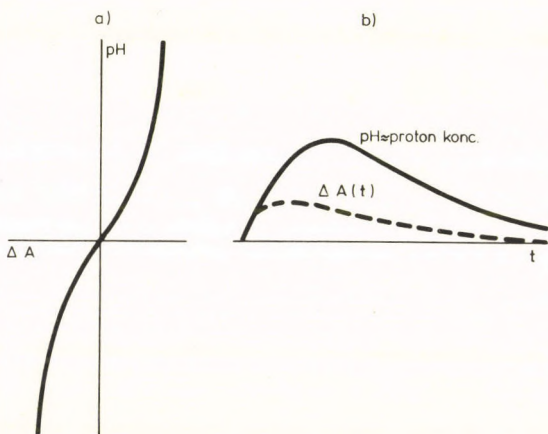
ahonnan

$$\frac{I_2 - I_1}{I_1} = \frac{\Delta I}{I_1} = 10^{-(\varepsilon_M - e_{\text{BR}}^{(410)})ncx} - 1 \quad (27)$$

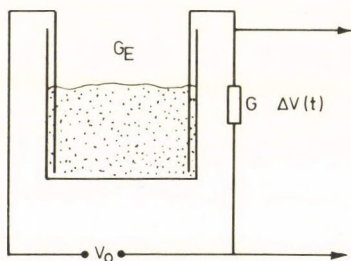
$\varepsilon_M = 4 \times 10^4$  l/molcm, tehát  $nc$  meghatározható. A megvilágított térfogat ( $\Delta V_g$ ) ismeretében  $N = nc \cdot 6 \times 10^{23} \Delta V_g$ .

A pH-érzékeny festékekkel végzett pH-, illetve protonkoncentráció-mérések hibásak lehetnek az időfüggés és a koncentráció-meghatározás vonatkozásában is. A pH-változás kalibrálását a festék színváltozásának mérésével végzik adott koncentrációjú HCl hozzáadásával. Természetesen a  $\text{H}^+$ -ionok ilyenkor homogénen oszlanak el az oldatban. A pm-ekből, vezikulákból, sejtekből kilépő protonok koncentrációeloszlása azonban nem homogén, a fotociklus  $\simeq 10$  ms ideje alatt csak mintegy  $8 \mu\text{m}$  távolságra diffundálnak. Ebben a rétegben a gerjesztés után 10 ms-mal az átlagos protonkoncentráció 10-szer nagyobb annál, mintha a protonok homogén eloszlásban lennének. Természetesen ez csak átlagérték és idő-, valamint helyfüggésben jóval nagyobb koncentrációk is előfordulnak. A homogén kalibráció nem alkalmazható, mert a festék színváltozása protonkoncentráció függvényében csak kis koncentrációváltozásokra (20—30%) lineáris, nagyobb koncentrációknál telítési jeleget mutat. Ez az idő mérését is hibássá teszi, mert a telítés után már nincs változás az abszorpcióban. A viszonyokat a 7. ábra szemlélteti.

Nyilvánvaló, hogy a protonok koncentráció- és időfüggésének mérésénél nem telítő módszert és a



7. ábra. A pH-érzékeny festékek abszorpcióváltozása a pH hatására. A  $\Delta A \leftrightarrow \text{pH}$  válasz függvény eltorzítja a pH-koncentráció változások hatását nagy lokális pH-változások esetén



8. ábra. A vezetőképesség-változás mérésére szolgáló elrendezés

kiértékeléshez a helyes egyenleteket (21—24) kell használni. Nem telítő módszerként a legegyszerűbb azt a tényt kihasználni, hogy a tranziensen felszabaduló protonok megváltoztatják az oldat vezetőképességét.

A 8. ábrán vázoljuk egy egyszerű mérőkör sémáját. Alapfeltevésünk, hogy fény hatására az oldatba kilépő proton azonnal megváltoztatja a vezetőképességet.  $\Delta V(t)$ -t a  $G$  külső vezetőképességen fellépő feszültségváltozást a következőképpen fejezhetjük ki, ha a minta vezetőképességének megváltozása  $G_E$ -hez képest kicsi:

$$\frac{\Delta V(t)}{V_0} = \frac{N_p(t)}{\Delta V_T} \cdot \frac{G_p G_E}{(G + G_E)^2} \cdot \frac{q}{l}, \quad (28)$$

ahol  $G_p$  a víz egy protonra vonatkozó fajlagos vezetőképessége (ez  $T = 22^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten  $5,56 \times 10^{-22} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $q$  a mért folyadékoszlop keresztmetszete,  $l$  hossza,  $G$ ,  $G_E$  és  $V_0$  definíciója a 8. ábrán található,  $\Delta V_T$  a mérőoldat teljes térfogata. (28)-ból

$$N_p(t) = \frac{\Delta V(t)}{V_0} \cdot \frac{(G + G_E)^2 l}{G_E G_p q}. \quad (29)$$

A mért  $\Delta V(t)$  függvényhez két exponenciálisból álló kifejezést illeszthetünk:

$$\Delta V(t) = \Delta V(0) (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \Delta V_T. \quad (30)$$

Ekkor

$$N_p(t) = \frac{(G + G_E)^2 l}{V_0 G_p G_E q} \cdot \Delta V(0) (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}). \quad (31)$$

A (21) és (31) egyenlet jobb oldala egyenlő, de nem ismerjük, hogy a  $k_1$  sebességi állandó  $k_e$  vagy  $k_v$ -nek felel meg. Ha  $k_1 = k_e$ , akkor

$$\phi_H^{(1)} = \frac{k_2 - k_1}{k_1} \cdot \frac{\Delta V(0)}{V_0} \cdot \frac{(G + G_E)^2}{G_E G_p N} \cdot \frac{l}{q} \Delta V_T, \quad (32)$$

ha  $k_1 = k_v$ , akkor

$$\phi_{H^+}^{(2)} = \frac{k_2 - k_1}{k_2} \frac{\Delta V(0)}{V_0} \frac{(G + G_E)^2}{G_p N \cdot G_E} \frac{l}{q}. \quad (33)$$

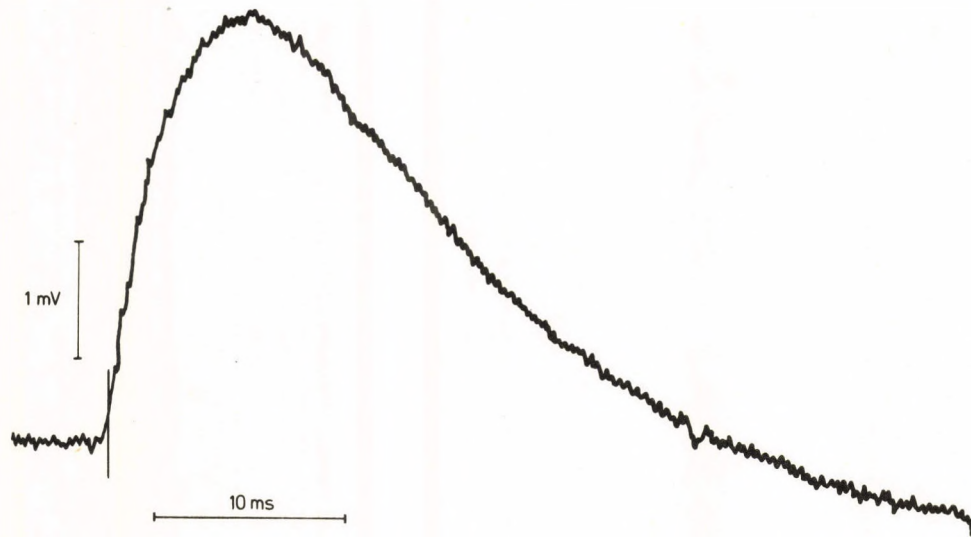
Minthogy

$$\phi_{H^+}^{(1)} = \frac{k_2}{k_1} \phi_{H^+}^{(2)}, \quad (34)$$

nyilvánvaló, hogy az időállandók sorrendjének megválasztásától függ a meghatározott sztöchiometria. A választás a (32) és (33) egyenletek között további okoskodást igényel. A gyakorlatban  $\phi_{H^+}^{(1)}$  és  $\phi_{H^+}^{(2)}$  négyes-ötös faktorialis különbözik, tehát az ésszerű érték kiválasztása nem túl bizonytalan.

A jelenségeket saját vizsgálataink alapján mutatjuk be. Vezetőképesség-mérés alapján meghatározott  $\Delta V(t)$  függvényt találunk a 9. ábrán. Az illesztésből  $k_1 = 79 \text{ s}^{-1}$ , és  $k_2 = 201 \text{ s}^{-1}$  [a zárójel csak ebben az esetben pozitív a (30) egyenletben megfelelően a pozitív  $\Delta V(t)$  értékeknek]. A fitelésből  $\Delta V(0) = 4,8 \text{ mV}$ . A mérésben  $V_0 = 9,8 \text{ V}$ ,  $G = 9,52 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$ ,  $G_E = 10^{-5} \Omega^{-1}$ ,  $q = 0,05 \text{ cm}^2$  és  $l = 0,7 \text{ cm}$  volt. A ciklusban az  $M$  állapotok számának mérése alapján  $N = 2,7 \times 10^{14}$  molekula vett részt. Ha  $k_e = k_1$ -et veszünk, akkor  $\phi_{H^+}^{(1)} = 1,07$ ,  $k_e = k_2$  esetén  $\phi_{H^+}^{(2)} = 2,71$ .  $k_e = 201 \text{ s}^{-1}$ ,  $\tau = 5 \text{ ms}$ -nek, az  $M$  állapotok élettartamának felel meg, és  $k_v = 79 \text{ s}^{-1}$ -nek megfelelő  $\tau_v = 12,5 \text{ ms}$  időállandó nem szerepel a fotociklusban, úgy véljük, hogy a  $\phi_{H^+}^{(1)} = 1$  értéket helyes elfogadjunk.





**9. ábra.** Vezetőképesség-változás  $V(t)$  időfüggése.  $V_0 = 9,8 \text{ V}$ ,  $G_E = 10^{-5} \Omega^{-1}$ ,  $G = 9,5 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$ ,  $l = 0,7 \text{ cm}$ ,  $q = 0,05 \text{ cm}^2$ .  
A görbe illesztéséből  $k_1 = 201 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 79 \text{ s}^{-1}$ .  $N$  értéke az  $M$  koncentráció méréséből  $2,7 \times 10^{14}$

#### 4.1.2. Protonemisszió-mérés folyamatos megvilágítással

Folyamatos megvilágítás esetén a ciklusban levő molekulák száma és nyilvánvalóan az oldatban levő protonok száma az időállandóknál jóval nagyobb  $t$  értékeknél egyensúlyba jut. Ekkor használhatjuk a szokásos lassú válaszü pH-mérő módszereket. Csak a kialakuló egyensúlyi koncentrációt határozzák meg, az időzítést általában nem. (KUSCHMITZ és HESS ilyen esetben is használt pH-érzékeny festéket és mérte az egyensúly kialakulásának és lecsengésének sebességi állandóját [47].)

A bR esetében jó közelítéssel jellemezhetjük a fotociklust a két nagy időállandójú komponenssel ( $M$  és  $O$  formák). Ekkor a (14a, b) egyenleteket használjuk az  $M$  komponens (14a) és az  $O$  komponens (14b) populációjának leírására. Az egyenletek az egyensúlyhoz vezető lépés időfüggését is megadják. Az egyensúlyi koncentrációk:

$$\bar{N}_M = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi \left(1 + \frac{k_M}{k_O}\right) + k_M} \quad (35)$$

és

$$\bar{N}_O = N_{00} \frac{\sigma\phi}{\sigma\phi \left(1 + \frac{k_O}{k_M}\right) + k_O} \quad (36)$$

A 4.1.1. részben nem tárgyaltuk részletesen, hogy a fotociklus és a protonciklus időállandói egyeznek-e, de folyamatos megvilágítás esetén a probléma fokozottabban merül fel. A protonemisszió a foto-

ciklushoz kapcsolódik. Teljes bizonyíték egyelőre nincsen, de több jel mutat arra, hogy a protonok az  $M$  forma bomlása során lépnek ki és az  $O$  bomlás során lépnek be a membránba. Ekkor  $k_e = k_M$ , és  $k_v = k_O$ . A kiértékelésben azonban egy ciklus gerjesztése esetén nem okoz problémát, ha esetleg a fotociklus időállandói eltérnek a protonemisszió és felvétel időállandóitól, mert a fotociklusok számát és a protonok számát egymástól függetlenül határozzuk meg. Az egyik ciklus elvben nem hat a másikra.

Más a helyzet a folytonos megvilágításnál, mert ebben az esetben sok ciklus átlagos számát és az oldatban levő átlagos protonszámot mérjük. Vegyük egyelőre a protonkilépésre az  $M$  bomlást és visszavételre az  $O$  bomlást, amely nagy valószínűséggel helyes pm-ek esetén. Az egyensúlyi protonkoncentráció az  $O$  állapot koncentrációjával arányos:

$$\bar{N}_p = \phi_{H^+} N_{00} \frac{\sigma \phi}{\sigma \phi \left( 1 + \frac{k_O}{k_M} \right) + k_O} \quad (37)$$

Abszorpcióméréssel (27. egyenlet)  $\bar{N}_M$ -t és pH vagy pH érzékeny festék méréssel  $\bar{N}_p$ -t határozhatjuk meg. A (35) és (37) egyenlet mutatja, hogy  $\bar{N}_p$  per  $\bar{N}_M$  nem egyenlő  $\phi_{H^+}$ -szal, hanem

$$\phi_{H^+} = \frac{\bar{N}_p}{\bar{N}_M} \cdot \frac{k_O}{k_M}. \quad (38)$$

Az egyenletből látszik, hogy nagy hibát követhetünk el, ha  $\phi_{H^+}$ -t a proton és  $M$  állapot koncentrációjából határozzuk meg, mert a sebességi állandókkal korrigálni kell. A (38) egyenlet azt az egyszerű tény

fejezi ki, hogy a mért  $\bar{N}_p$  attól függ, hogy a protonok mennyi időt töltenek szabadon az egész fotociklus idejéből. Valószínű, erre a tényre vezethetők vissza azok az állítások, amelyek szerint  $\phi_{H^+}$  erősen függ az oldat pH-jától és a sókoncentrációtól pm-ek esetében [43, 47]. Mindezek befolyásolják  $k_o$  és  $k_M$  értékét. Ha korrigálunk, akkor  $\phi_{H^+}$  pH-tól és sókoncentrációtól függetlenné válik [47].

Tegyük fel, hogy a protonciklus időállandóiban jórészt független a fotociklustól. A gyakorlatban olyan eset valósul meg, amelyben a proton visszavétel nagyon lelassul. Ez a helyzet sejtek és zárt vezikulák esetében, amíg a zárt sejt vagy vezikula membránon a protonok visszaáramlása egyensúlyba nem jut a kiáramlással. Tegyük fel most is, hogy a protonok a fotociklus  $M$  állapotának bomlásakor lépnek ki. A visszavétel időállandója legyen  $k_v$ . Ekkor a protonkoncentráció időbeli változása az oldatban:

$$\bar{N}_p(t) = k_M \phi_{H^+} \bar{N}_M - k_v \bar{N}_p(t). \quad (39)$$

Itt feltettük, hogy az  $M$  állapotok koncentrációja a visszavételhez képest nagyon gyorsan egyensúlyba jut. Egyébként  $\bar{N}_M$  helyébe az időfüggő formulát (14a egyenlet) kellene (39) egyenletbe írni. Egyensúlyban:

$$\phi_{H^+} k_M \bar{N}_M = k_v \bar{N}_p, \quad \text{és} \quad (40)$$

$$\phi_{H^+} = \frac{k_v}{k_M} \frac{\bar{N}_p}{\bar{N}_M}. \quad (41)$$

Visszakapjuk a (38) egyenletet  $k_v = k_o$  megfeleltetéssel. Az egyensúlyi koncentrációértékeket most is a



megfelelő időállandókkal kell korrigálni, hogy  $\phi_{H^+}$  helyes értékét meghatározzuk.

A (39) egyenlet megoldása:

$$N_p(t) = \frac{k_M}{k_v} \phi_{H^+} \bar{N}_M (1 - e^{-k_v t}). \quad (42)$$

Az időállandók problémájától bizonyos körülmények között megszabadulhatunk. Ha  $1/k_M \ll t \ll 1/k_v$ , akkor:

$$\frac{N_p(t)}{t} = k_M \phi_{H^+} \bar{N}_M, \quad (43)$$

vagyis a protonkoncentráció-változás induló meredeksége  $k_M \bar{N}_M \phi_{H^+}$ -val arányos.  $k_M \bar{N}_M$  az időegység alatt elbomló, tehát az egyensúly miatt az időegység alatt keletkező  $M$  állapotok koncentrációja, ez pedig arányos az időegység alatt abszorbeált fotonok számával ( $N_\phi$ ), ami külön mérhető:

$$k_M \bar{N}_M = \phi_c N_\phi. \quad (44)$$

A  $\phi_c$  arányossági tényező megadja, hogy egy abszorbeált foton esetében hány fotociklus indul. Ebből:

$$\phi_{H^+} = \frac{N_p(t)}{t} \frac{1}{\phi_c N_\phi}. \quad (45)$$

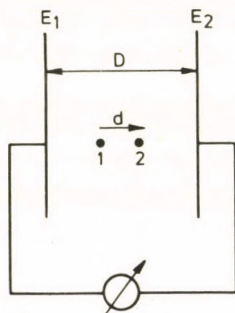
Az utóbbi egyenlet az alapja Bogomolni et al. módszerének [48], amellyel élő sejteken határozták meg  $\phi_{H^+}$ -t. Eredményül  $\phi_{H^+} \simeq 2$  adódott, ha a pm-ek esetében meghatározott  $\phi_c = 0,3$  értéket használták (45) egyenletben.

Felmerül azonban a kérdés, hogy  $\phi_c$  értéke élő sejtekben levő bR-molekuláknál nem különbözik-e a pm-en kapott értéktől.

#### 4.2. A protonok áthaladása a bR-molekulán

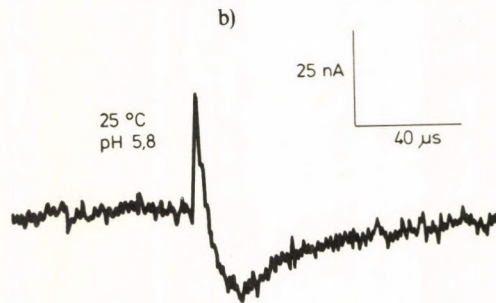
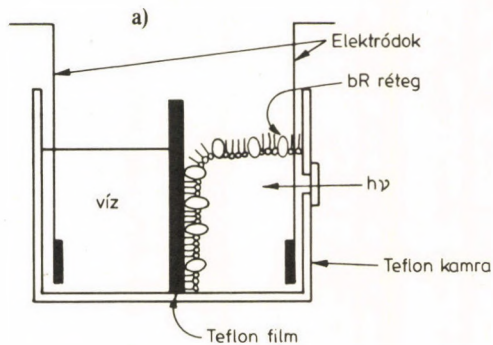
A mérésekből világos és egyértelmű, hogy a bR-molekula egy fotont abszorbeálva proton(oka)t visz át a membrán egyik oldaláról a másikra. Vitatott a protonemisszió és visszavétel ideje és a proton/fotociklus szám. Az elvégzett vizsgálatok alapján valószínű, hogy az emisszió az *M* forma bomlásához, a visszavétel az *O* forma bomlásához társul és  $\phi_{H^+} \simeq 1$ .

A protonoknak valahogy át kell jutni a bR-molekulán. Felmerül a kérdés, hogy megfigyelhető-e a protonmozgás a fehérjén belül. Úgy képzelhetjük, hogy a fehérje dielektrikum (dielektromos állandója  $\simeq 2$ ), és ebben mozognak a protonok. A töltésmozgás a külső körben eltolódási áramot indukál (10. ábra), amely kedvező körülmények között mérhető. A lehetőséget úgy teremthetjük meg, hogy sok bR-molekulában egy időben, azonos irányban mozogja-



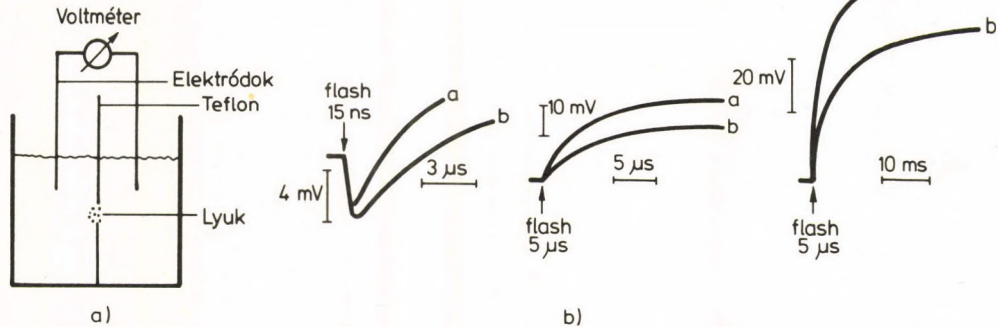
10. ábra. Szigetelőben elmozduló töltés eltolódási áramot indukál a külső körben.  $E_1$ ,  $E_2$  elektródok  $D$  távolságban

nak a protonok. Ehhez flash gerjesztés és orientált minta szükséges. Vizsgálódásaink megkezdése előtt az orientált minta előállítására két nem túl jól definiált rendszert dolgoztak ki. Az első rendszerben [49, 50] a pm-eket habos anyagba kötötték, amelyet vízfürdő segítségével megközelítőleg 6  $\mu\text{m}$  vastag teflon lemezhez szorítottak (11/a ábra). A teflon egyrészt elektromosan szigeteli a két elektród közt az elektrolitot, másrészt a két elektrolit közt kapacitív kapcsolatot létesít, amelyen gyors eltolódási áramok átjuthatnak. A pm-ek többé-kevésbé orientáltan épülnek be a habos anyagba, mert lézer fényimpulzusok hatására a 11/b ábrán látható kétfázisú áramjelet lehetett mérni. Az amplitúdók és időállandók függtek a hőmérséklettől és pH-tól. A szerzők a jeleket a protonpumpálással hozták összefüggésbe. A másik rendszer [51] alapja a két vizes térrészt elválasztó teflon lemez, amelyen 1–2 mm átmérőjű lyuk van kollódium hártáival lefedve (12/a ábra). A lyukacsos kollódium hártát lipid anyagokkal itatják át, ily módon  $10^6$ – $10^7$   $\Omega$  ellenállású vékony elválasztó hártya képződik. Az egyik térrészbe szuszpendált pm-ekből néhány óra alatt orientált réteg tapad fel a hártáira. Lézer impulzusra a 12/b ábrán látható válaszjelet kapták. A jel mutatja, hogy a protonpumpálás hatására potenciál épül fel. A jel a felépülő potenciállal, tehát a proton transzlokáció irányával ellentétes irányú jellel indul, tehát a két fázisú jel itt is megfigyelhető. Az időállandók meghatározásából a szerzők arra következtettek, hogy a potenciál két nagyobb lépésben épül fel. Ez a mérés többet mond, mint az



**11. ábra.** a) HONG és MONTAL mérőrendszere. A habos anyagba kötött bR-molekulákat a vízfürdő a teflon réteghez szorítja. b) A mért elektromos áram jelek lézergerjesztés után





12. ábra. a) DRACHEV és munkatársai mérőrendszere. A teflon lemezben 1—2 mm átmérőjű lyukat kollódium hártya fedi le, ehhez ragasztják a pm-eket. b) A mért feszültségek lézergyjlesztés után (a) fény-, b) sötét adaptált minta)

mint az első rendszer eredményei, de itt a bR-en belüli mozgás okozta áram és a membránpotenciál felépülése együttesen jelentkezik, továbbá a feszültségmérés következtében a két jelenség integrálját kapjuk.

A laboratóriumunkban kidolgozott szuszpenziós módszer adott először képet a protonok bR-en belüli mozgásáról zavaró körülményektől mentesen [52, 53, 54, 55, 56]. A módszer lényege a következő: pm-ek vizes szuszpenziójára elektromos teret kapcsolunk, amely azokat orientálja. Lézer impulzussal mintegy  $10^{15}$  bR-molekulát gerjesztünk, ennyi proton mozog egy irányba, amely jól mérhető áramot gerjeszt egy külső mérőkörben. Az áram intenzitását és időfüggését mérjük. Minthogy makroszkopikus mennyiségű bR-molekulát gerjesztünk, azonos mintán, azonos körülmények között, regisztrálhatók a fotociklust jellemző abszorpcióváltozások is. A következőkben a módszert és az eredményeket részleteiben is kifejtjük.

#### 4.2.1. A pm-ek orientálása

A *Halobacterium halobium*ból kivont pm-eket átlagosan 500 nm átmérőjű korongnak képzelhetjük el, melyeknek vastagsága 5 nm [7]. Vizes oldatban a korongok nyilvánvalóan rendezetlenül helyezkednek el. Elektromos tér hatására rendeződhetnek. Az elektromos tér kétféle módon léphet kölcsönhatásba az oldatban levő részecskékkel:

a) A részecskék felületén levő töltésekkel szemben álló árnyékoló töltéseket a felület mentén

elmozdíthatja, ily módon a részecskékben dipólnyomatékokot indukál, s a részecskéket rendezi.

b) A részecskéknek lehet permanens dipólnyomatékuk, a rendezés a dipólok elforgatásával is történhet. A pm-eknek a kísérlet szerint van permanens dipólnyomatékuk, amely merőleges a korong síkjára, de dipólnyomaték indukálható is a felületükön (az indukált dipólnyomaték a korong síkjában van, az arra merőleges komponens elhanyagolható).

A részecskék rendeződésének mérésére a lineáris dikroizmus jelenségét használhatjuk [57]. Az elektromos tér hatására a lineárisan poláris fény abszorpciója ( $A$ ) megváltozik ( $\Delta A$ ) a következő egyenletek szerint:

$$\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = -\frac{1}{A} \log \left( 1 + \frac{\Delta I_{\perp}}{I} \right) = \Phi(E) \left( \frac{3}{2} \sin^2 \Theta - 1 \right), \quad (46a)$$

$$\frac{\Delta A_{\parallel}}{A} = -\frac{1}{A} \log \left( 1 + \frac{\Delta I_{\parallel}}{I} \right) = \Phi(E) (3 \cos^2 \Theta - 1), \quad (46b)$$

ahol  $\perp$  és  $\parallel$  jelenti az eredményeket, ha a fény polarizációs síkja merőleges, illetve párhuzamos a rendező elektromos tér irányával.  $I_0$  fényből a mintán  $I$  jut keresztül elektromos tér nélkül  $\left( A = \log \frac{I_0}{I} \right)$ ,  $\Delta I_{\perp}$  és  $\Delta I_{\parallel}$  a fényintenzitás változása az elektromos tér hatására. A bR-molekulában a látható színeképtartományban a retinál a fényabszorbeáló egység, amelynek átmeneti dipólmomentum vektora és a korongok normálisa közti szög  $\Theta$ .  $\Phi(E)$  az elektromos térerősségtől függő függvény.

SHAH dolgozta ki az elméletet, amely megadja a  $\Phi(E)$  függvényt olyan korong alakú részecskékre, amelyeknél a permanens és indukált dipólnyomaték egymásra merőleges, mint a pm-ek esetén [58]. Eszerint:

$$\Phi(E) = \frac{3}{4\gamma} \left[ \frac{\beta^2}{2\gamma} + 1 + \frac{e^{-\left(\frac{\beta^2}{4\gamma} + \gamma\right)} \left\{ \frac{\beta}{2\sqrt{\gamma}} (e^{-\beta} - e^{+\beta}) - \sqrt{\gamma} (e^{-\beta} + e^{+\beta}) \right\}}{I} \right],$$

ahol

$$I = \int_{t_1}^{t_2} e^{-x^2} dx. \quad (47)$$

A betűk jelentése:

$\gamma = \alpha E^2 / k_B T$ ,  $\alpha$  a polarizálhatóság,  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\beta = \mu E / k T$ ,  $\mu$  a permanens dipólnyomaték;  $x = \sqrt{\gamma} u - \beta / 2\sqrt{\gamma}$ ,  $t_1 = -\sqrt{\gamma} - \beta / 2\sqrt{\gamma}$ ,  $t_2 = \sqrt{\gamma} - \beta / 2\sqrt{\gamma}$ ;  $u$  integrációs változó. Határesetben:

$$\Phi(E)_{E \rightarrow \infty} = -\frac{1}{2}. \quad (48)$$

Ha  $\beta = 0$ , akkor

$$\Phi(E)_{E \rightarrow \infty} = -\frac{1}{2}. \quad (49)$$

Ha  $\gamma = 0$ , akkor

$$\Phi(E)_{E \rightarrow \infty} = 1. \quad (50)$$

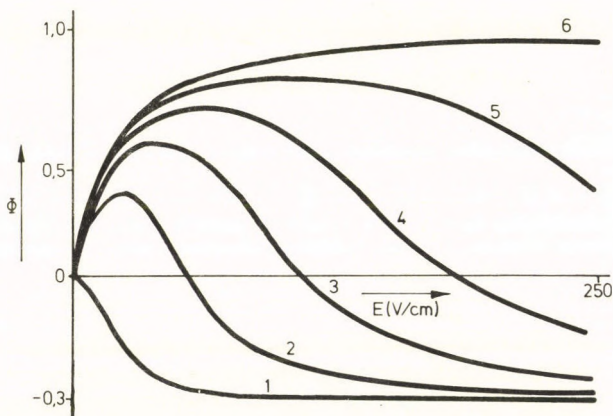
Az utóbbi eset csak közelítésként valósul meg, mert a részecskék felületén — bármily kis mértékben is — elmozdulnak a töltések, és akkor már van



indukált dipólnyomaték. Az egyenletekből látszik, hogy a kétféle dipólnyomaték a rendezést különbözőképpen végzi, mert határértékben a permanens dipól esetében  $\Phi(E) > 0$ , a másik esetben  $\Phi(E) < 0$ . A permanens dipól szerinti rendezés a korongok normálisát irányítja az elektromos térrel párhuzamosan. Ilyenkor beszélhetünk csak orientálásról, mert minden korong permanens dipólnyomatékának pozitív töltésű része a negatív elektród felé fordul. Az indukált dipólnyomaték révén rendezett korongok síkja párhuzamos az elektromos tér irányával.

Az elektromos tér csak egy irányt jelöl ki, e körül a rend hengersizmetrikus. Az orientálás esetén minden pm merőleges a tér irányára, de a retinálók átmeneti dipólnyomatéka egy  $\Theta$  nyílásszögű kúpon található. Az indukált dipólnyomaték alapján történő rendezésnél a korongok a tér iránya körül legyezőszerűen helyezkednek el. A  $\Phi(E)$  függvényt kiszámítottuk különböző  $\beta^2/\gamma$  arányokra, ezt a 13. ábrán mutatjuk be.

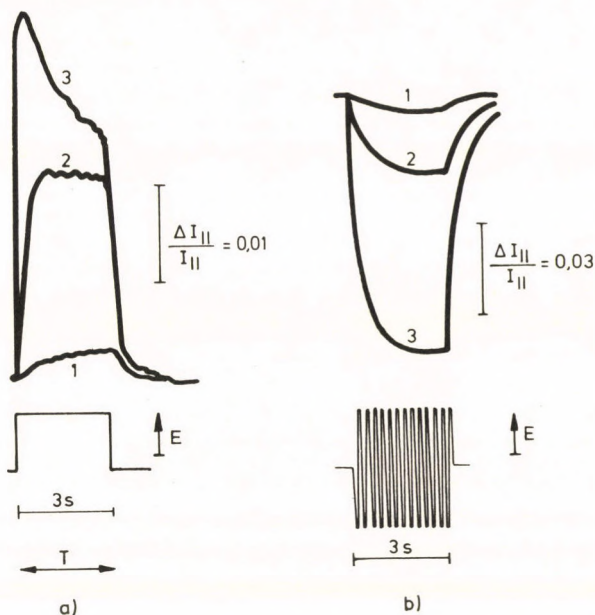
A legegyszerűbb a permanens és indukált dipólnyomaték hatására történő rendezés szétválasztása változó irányú elektromos térben. Megfelelő nagy frekvencia esetén csak az indukált dipólnyomaték alapján rendeződnek a korongok. Ugyanis az indukált dipólnyomaték együtt mozog a tér irányával, amely így állandóan hatva behúzza a korongokat a rendbe, míg a permanens dipólnyomaték hatása a sűrűn változó irány miatt nem érvényesül. Konstans elektromos tér mindkét nyomatékra hat, de  $\beta^2/\gamma \gg 1$



13. ábra.  $\Phi(E)$  függvények különböző  $\beta^2/\gamma$  értékeknél. (Az 1, 2, 3, 4, 5 és 6 görbékét rendre  $\beta^2/\gamma = 0, 15, 30, 50, 90$  és  $\infty$  értékekre számítottuk)

esetén kis térerősségeknél a permanens nyomaték révén valódi orientálást észlelhetünk.

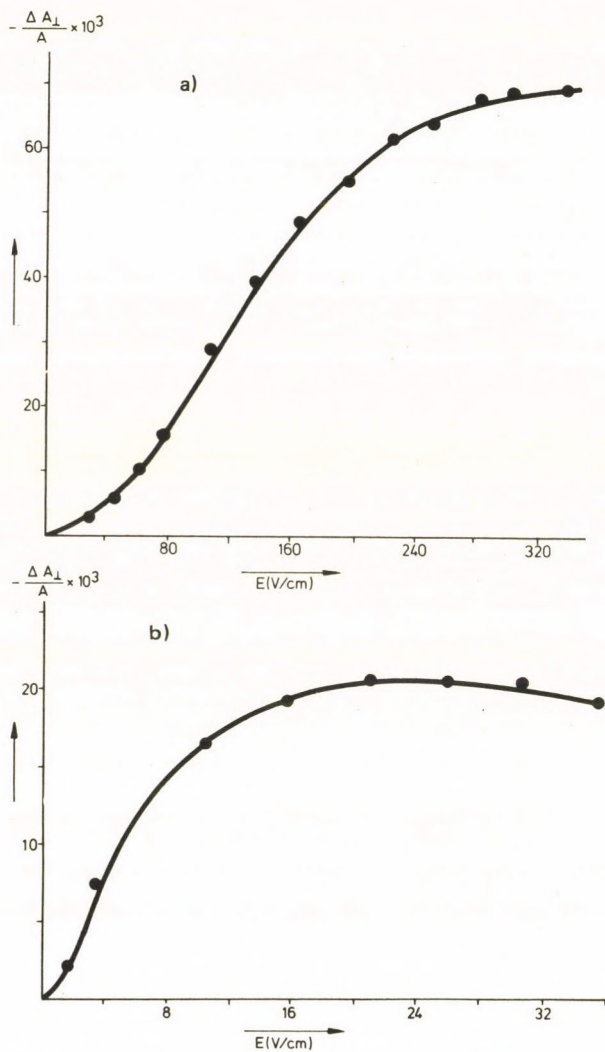
A pm-ek esetén végzett méréseket a 14. ábrán mutatjuk b [54]. Jól látható, hogy a pm-eknél kis egyenirányú elektromos tereknél ( $< 20\text{--}30\text{ V/cm}$ ) a permanens dipólnyomaték dominál, kb.  $20\text{ V/cm}$  térerősségnél az orientáció telítést ér el (pontosabban a 15/b ábrán láthatjuk ezt). Változó feszültség esetén a telítés  $200\text{--}250\text{ V/cm}$ -nél következik be (15/a ábra). A vizsgálatok szerint mind a permanens dipólnyomaték értéke ( $\mu$ ), mind az indukált dipólnyomatékre jellemző polarizáció ( $\alpha$ ) pH függő.  $\mu$  pH  $4,5\text{--}5$  között előjelet is vált [54]. Meghatároztuk a maximumhoz tartozó pH értéknél az egy bR-molekulára vonatkoztatott dipólnyomatékot  $\mu(\text{bR})$



**14. ábra.** Fényintenzitás változások *a*) konstans elektromos térben ( $E_{1,2}$ ) = 1,7; 5,2; 15,8 V/cm, és *b*) váltakozó elektromos térben ( $E_{1,2,3}$ ) = 31; 77; 165 V/cm (csúcsérték)

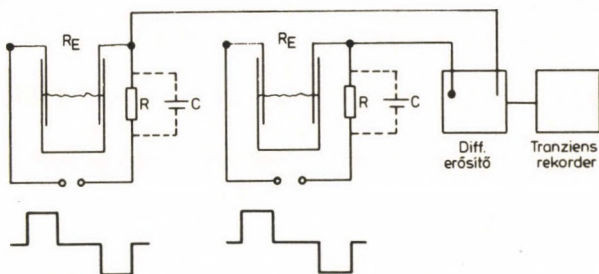
$= 2,1 \times 10^{-28}$  Cm, vagy szokásos egységekben 60 Debye.

A pm-eknek a permanens elektromos dipólnyomaték mellett elektromos töltésük is van, ezért elektromos térben elektroforetikusan is vándorolnak. Hogy az ebből eredő problémákat elkerüljük, az orientáló elektromos teret pozitív és bizonyos idő múlva negatív irányba is rákapcsoltuk a mintára ugyanannyi ideig (14/a ábra). A fotociklussal társult elektromos jelek mérésénél mindig így jártunk el.



15. ábra.  $\Delta A/A$  az elektromos térerősség függvényében  
a) váltakozó, b) konstans elektromos tér



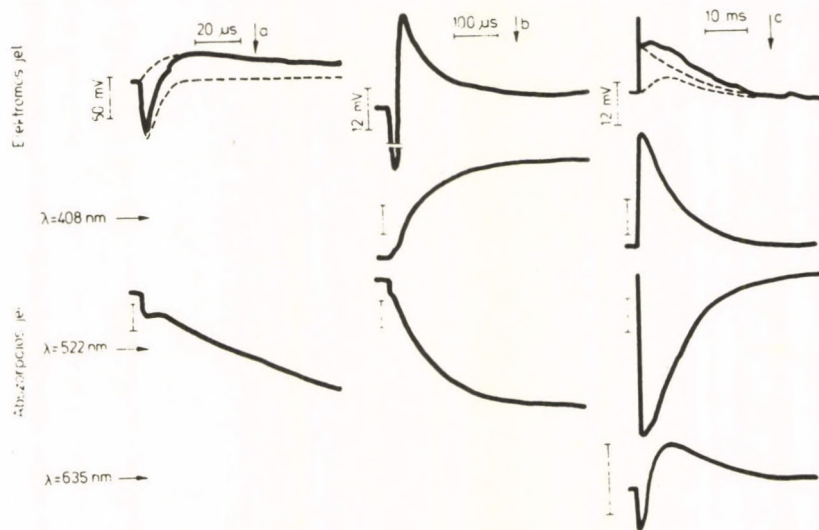


**16. ábra.** Az elektromos jelek mérése.  $R_E$  a pm-eket tartalmazó szuszpenzió,  $R$  a mérő ellenállás,  $C$  a szórt kapacitás. A Pt-elektrodok közvetlenül a szuszpenzióba merülnek

#### 4.2.2. Az elektromos jel

A membránon, illetve a bR-en belül mozgó töltés indukálta eltolódási áram mérésére a 8. ábrán látható egyszerű mérőeszközt használjuk. A 16. ábrán bemutatjuk a tényleges mérőrendszert. Az orientáló feszültség az  $R$  ellenálláson néhány V feszültségesést okoz. A fotociklus gerjesztésekor létrejövő, mérendő feszültség 1—100 mV nagyságú, amely erre a jelre szuperponálódik. A jel erősítését és regisztrálását az teszi lehetővé, hogy két, lehetőleg azonos kört készítünk (lásd 16. ábra), és az  $R$  ellenállásokról a jelet differenciálerősítőbe vezetjük. A lézer flash csak az egyik pm szuszpenziót világítja meg, a hatására keletkező elektromos jelet erősíti csak a differenciálerősítő.

A 17. ábrán egy reprezentatív méréssorozatot mutatunk be. Az elektromos jelek mellett bemutatjuk az azonos mintán, különböző hullámhosszú



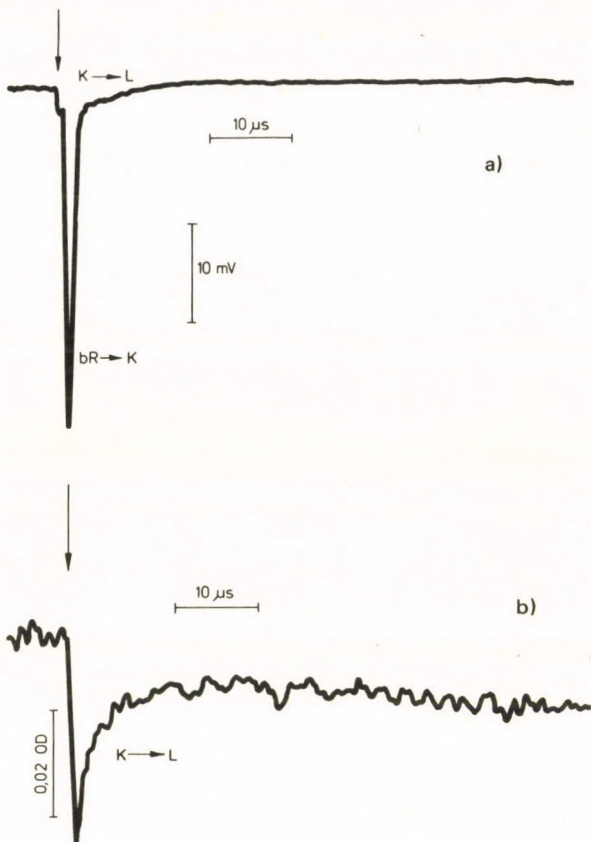
**17. ábra.** Az elektromos jelek és a fényabszorpciós jelek (különböző hullámhosszokon) összehasonlítása. (a—c) különböző időfelbontással mért jelek. Az (a) és (c) oszlopban található szaggatott vonalak az elektromos jelek dekompozícióját jelzik. Bibrommembránok  $\text{H}_2\text{O}$  szuszpenziója,  $A = 1,8$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ , orientáló feszültség  $8,5\text{ V}$ . Az abszorpciós jeleknél a lépték minden esetben  $\Delta I/I = 0,1$  értéket jelez. Pozitív jel esetén  $\Delta I < 0$

fénnyel mért jeleket is. Jól látható, és a részletesebb vizsgálat is azt mutatta, hogy az elektromos jel egyes komponenseinek időállandója és az abszorpciós jelek időállandója között azonosság van. Az első pozitív jel felfutása a  $K \rightarrow L$  átmenet, lefutása az  $L \rightarrow M$  átmenet időállandójával egyezik. A hosszú élet-tartamú pozitív jel felbontható egy  $M \rightarrow O$  és egy  $O \rightarrow bR$  átmenetre jellemző komponensre.

Az első negatív komponens összetett jel, amelyet külön vizsgáltunk. A mintát lehűtve a folyamatok lelassulnak, és a gyors folyamatok könnyebben elkülönülnek. A 18. ábra mutatja a  $T = 5^\circ\text{C}$  hőmérsékleten regisztrált elektromos és a megfelelő abszorpciós jelet. Látható a nagy negatív komponens, amely az elektronika időállandójával követi a lézer impulzust ( $\sim 1 \mu\text{s}$ ), és jóval kisebb negatív amplitúdónál kapjuk a  $K \rightarrow L$  átmenetnek megfelelő elektromos jelet.

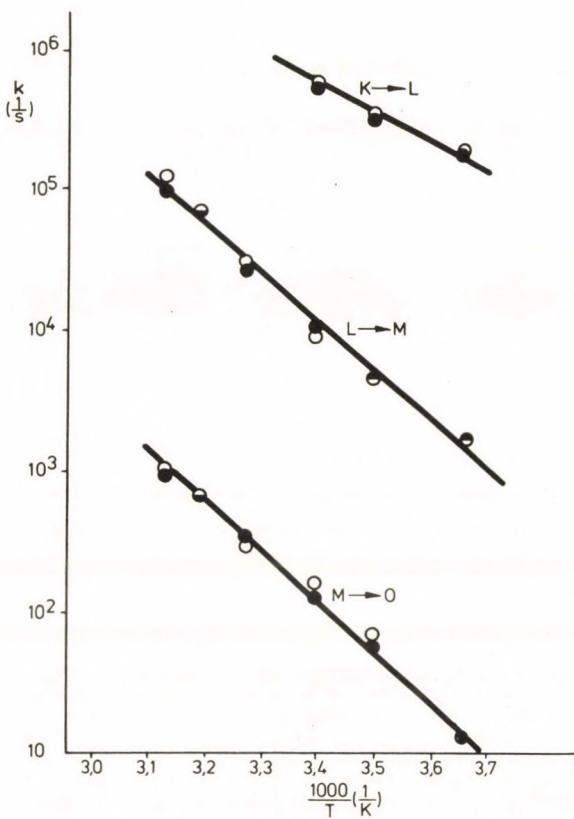
Egy széles hőmérséklet-tartományban végzett mérésorozat nagyon jó egyezést mutatott a megfelelő elektromos és optikai jelek időállandói között (19. ábra). A pH-függés tanulmányozása is hasonló eredményre vezetett a pH 5–8 tartományban (20. ábra). Nagyobb pH-nál az elektromos és abszorpciós jelek időállandói szétestek. Mindenesetre levonhatjuk azt a következtetést, hogy fiziológiás pH-tartományban 5–40 °C hőmérséklet-tartományban az elektromos és abszorpciós jelek időállandói a mérések hibáján belül megegyeznek.

A szuszpenzió hőmérsékletét még tovább csökkentve, az első nagy negatív jelről kiderült, hogy két komponenst tartalmaz [59]. A pm-eket 40%

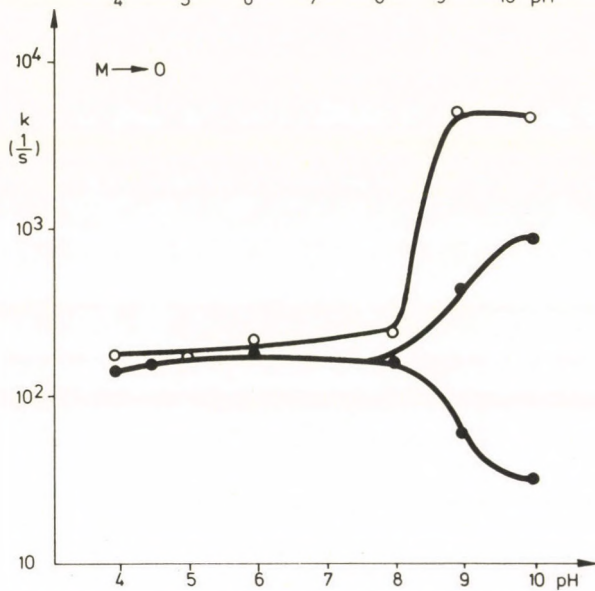
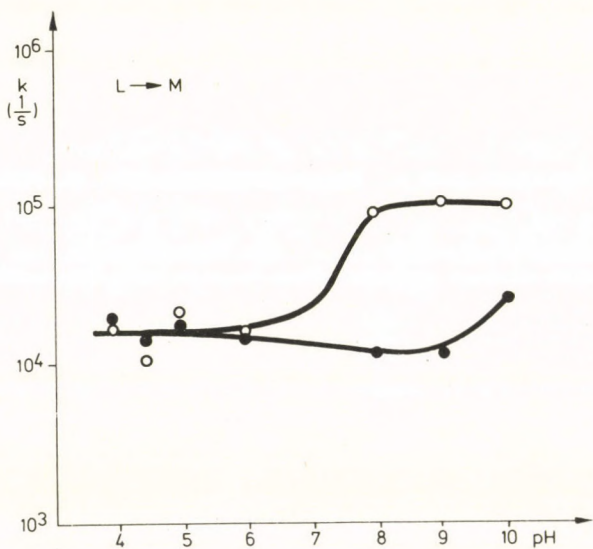


**18. ábra.** Elektromos *a)* és abszorpciós *b)* jelek  $T=5^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ )





**19. ábra.** Elektromos (○) és abszorpciós (●) jelek sebességi állandóinak hőmérsékletfüggése

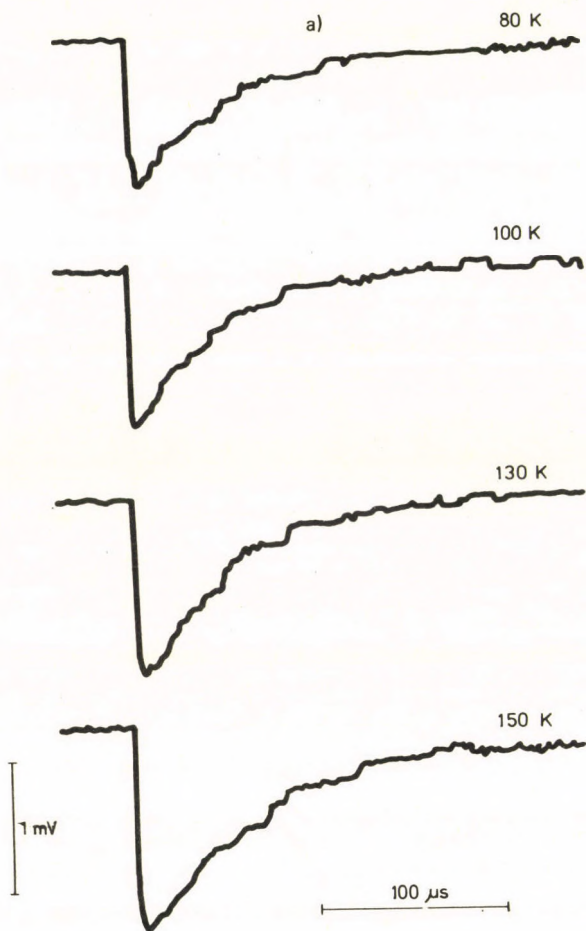


20. ábra. Elektromos (○) és abszorpció (●) jelek állandóinak pH-függése

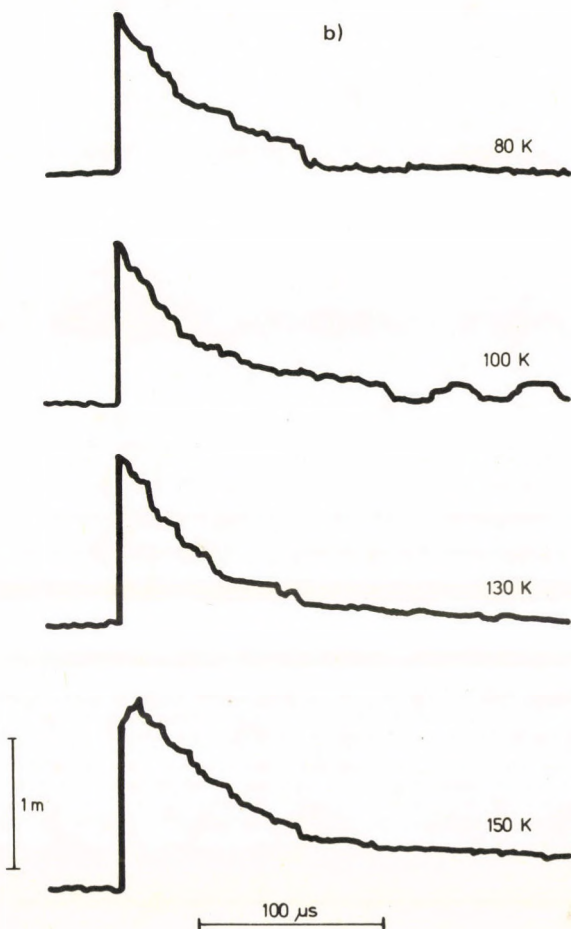
glicerin, 60% vízben szuszpendálva szobahőmérsékleten orientáltuk, majd kb. 2 perc alatt cseppfolyós nitrogén hőmérsékletére hűtöttük. Az orientáció ezen a hőmérsékleten befagy, az elektromos jeleket orientáló tér nélkül is mérhetjük, tehát egy kör elegendő (lásd 16. ábra).  $T=80$  K hőmérsékleten a fotociklus időállandói olyan nagyok, hogy az praktikusán csak a  $K$  állapotig jut el. Ezt pl. a  $bR$  zöld fényimpulzussal való gerjesztésével érhetjük el. A  $K$  állapotból piros fényimpulzussal visszahajthatjuk a molekulát az alapállapotba. A zöld és a zöld után piros fénnel gerjesztett átmenetekhez — a várakozásnak megfelelően — negatív és pozitív elektromos jel társul, amely 80—140 K között lényegében nem változik (21. ábra). A jelekből ki lehet mutatni, hogy felfutásuk ( $\approx 3 \mu s$ ) követi a gerjesztéshez itt használt flash lámpa fényének időtartamát, lefutása függött a körbe kapcsolt ellenállástól, amplitúdója viszont nem.

150—160 K felett megváltozik az elektromos válaszjel jellege (22. ábra). A régebbi jelre ráül egy újabb komponens, amely jóval nagyobb amplitúdójú és élettartamú. Az új jel amplitúdója függ, élettartama nem függ a mérőellenállástól (23. ábra).

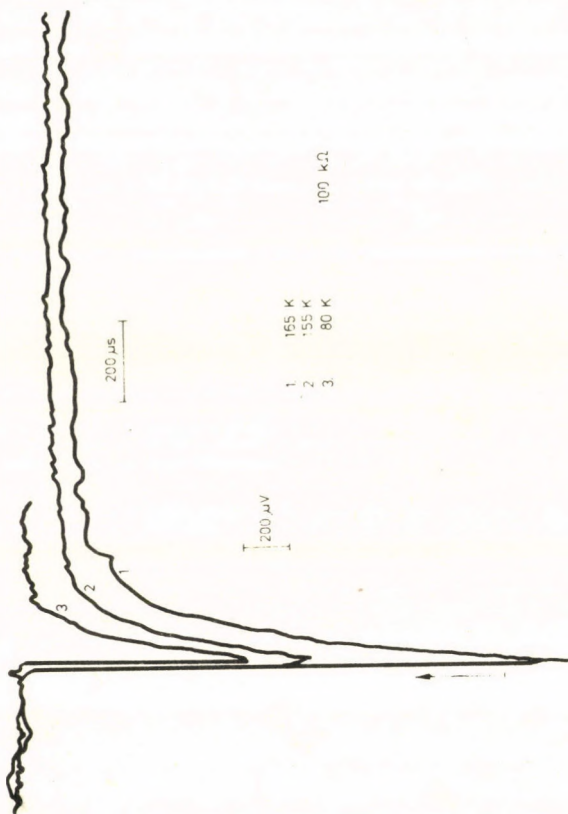
A bomlási görbe nem exponenciális 160 és 190 K között, nagyobb hőmérsékleten igen. Ezt mutatja a 24. ábra. A 190 és 220 K közti tartományban regisztrált adatokból meghatároztuk az új komponens Arrhenius-paramétereit (18. egyenletből):  $A' = 7 \times 10^{12} s^{-1}$ ,  $\Delta H = 35 \pm 5$  kJ/mol. Az új jel is negatív zöld gerjesztésre, a piros gerjesztés pozitív jelt adva visszaviszi a  $bR$  alapállapotába a molekulákat.

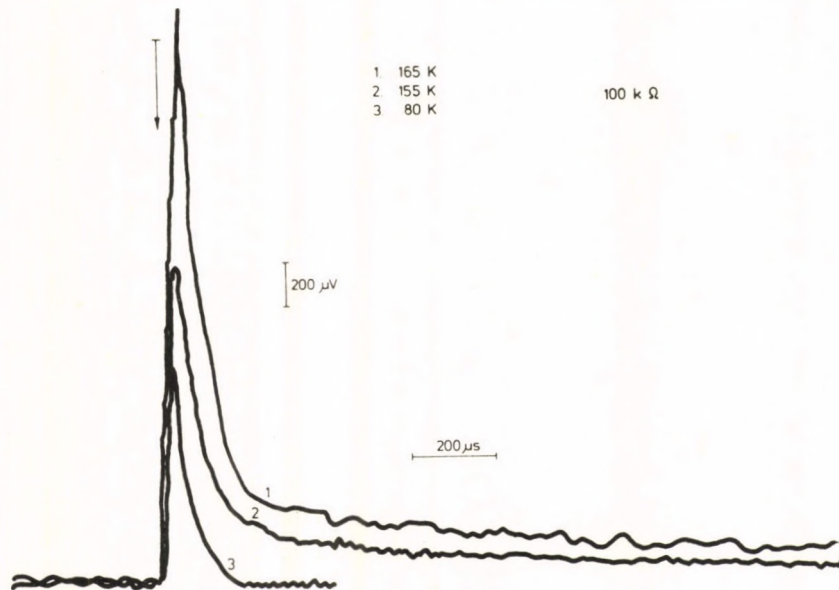




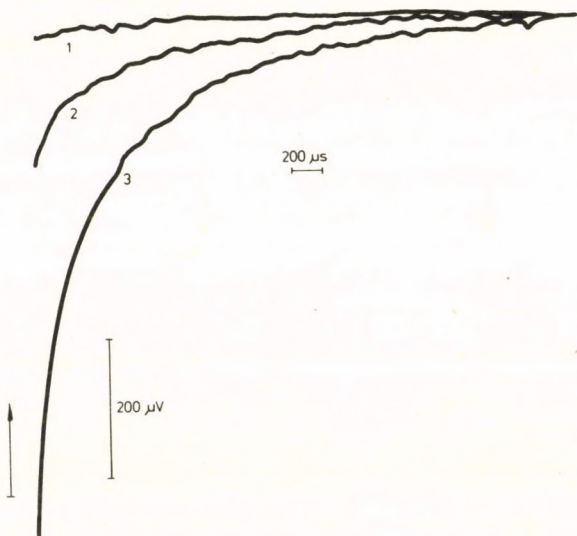


**21. ábra.** Elektromos jelek 40% glicerín—víz szuszpenzióban orientált pm-ek esetében különböző hőmérsékleteken. *a)* Zöld fény gerjesztés, *b)* zöld fény gerjesztés után vörös fény gerjesztés





**22. ábra.** Körülmények azonosak a 21. ábrával, csak a hőmérsékletértékek különböznek. Jól látható 155 és 165 K-en a jelek jellegének változása

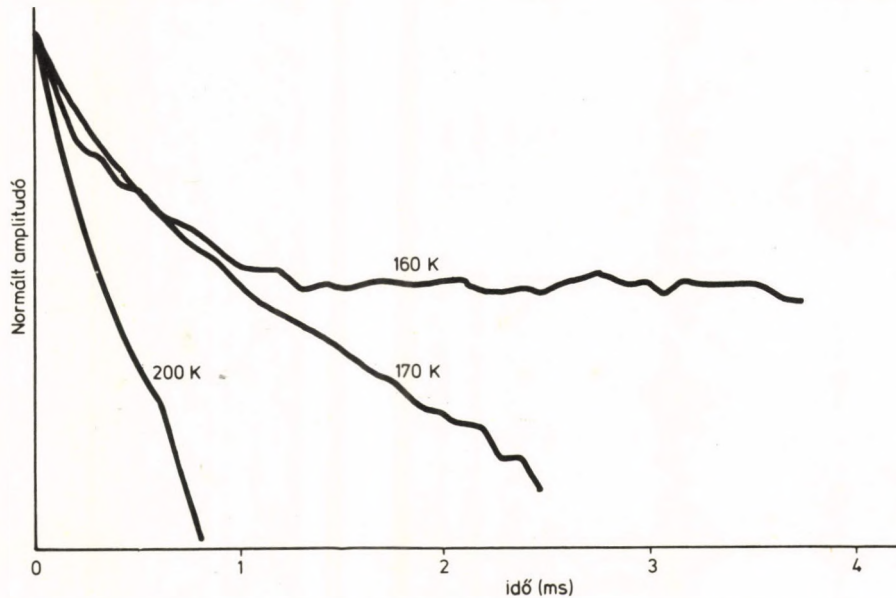


**23. ábra.** A jelek amplitúdójának függése a mérő ellenállásától.  
 $1: R = 10 \text{ k}\Omega$ ,  $2: R = 50 \text{ k}\Omega$ ,  $3: R = 100 \text{ k}\Omega$

A paramétereiből  $\tau = 0,2\text{—}0,3 \text{ }\mu\text{s}$  élettartamot lehet meghatározni  $5^\circ\text{C}$  hőmérsékletre, ebből következik, hogy az  $1 \text{ }\mu\text{m}$ -es lézerrel mért jelekben éppen nem láthatjuk külön az új komponenst.

Más mérésekből ismeretes, hogy a  $K$  forma előtt, amely az  $L$  formába bomlik egy másik forma is létezik [31, 60]. Ezt a formát nevezhetjük  $K'$ -nek, amely  $10\text{—}20 \text{ ps}$  alatt kialakul, és szobahőmérsékleten  $\sim 100 \text{ ns}$  alatt bomlik a  $K$  formába. A két forma között kis különbség van az UV, az infravörös és a látható spektrumtartományban is. Felmerült a gondolat, hogy a gyorsan megjelenő jelet a  $bR \rightarrow K'$ , a lassan megjelenő jelet a  $K' \rightarrow K$  átmenethez társítjuk.





24

**24. ábra.** Az elektromos jelek amplitúdójának logaritmusának az idő függvényében. 160 és 170 K hőmérsékleten a bomlás nem exponenciális. Az amplitúdókat normáltuk  $t=0$  időben

A további vizsgálatok azonban meggyőzően mutatták, hogy a „lassú” elektromos jel időállandói nem egyeznek a  $K' \rightarrow K$  átmenetnek megfelelő optikai jelek időállandóival, hanem a minta ionkoncentrációja határozza meg az értékeket. Ezért úgy véljük, hogy a  $bR \rightarrow K'$  átmenet alatt egyetlen nagy amplitúdójú jel keletkezik, amely a minta elektromos viszonyai miatt jelentkezik kettős jelként. A szétválás pontos magyarázatát még nem sikerült megtalálnunk. Valószínűnek tűnik, hogy a  $K' \rightarrow K$  átmenethez nem kimutatható elektromos jel társul. A továbbiakban a két jeltípust külön tárgyaljuk.

Ezek szerint a fotociklussal összesen 6 különböző időállandójú és amplitúdójú elektromos jel társul:

1. Negatív jel, nagyon gyors (más méréseinkből gyorsabb, mint 30 ps).

2. Negatív jel, szobahőmérsékleten mintegy 100 ns élettartamú. Arrhenius-paraméterei 200 K körül:  $A' = 7 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta H = 35 \pm 5 \text{ kJ/mol}$ . Elektronikus eredetű. A két jel együttesen felel meg a  $bR \rightarrow K' \rightarrow K$  átmenetnek.

3. Negatív jel, szobahőmérsékleten 3  $\mu\text{s}$  élettartamú. Arrhenius-paraméterei:  $A' = 1 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta H = 52 \text{ kJ/mol}$ , megfelel  $K \rightarrow L$  átmenetnek.

4. Pozitív jel, anya—leány típusú (lásd 8. egyenlet), az egyik időállandó a  $K \rightarrow L$ , a másik az  $L \rightarrow M$  átmenethez tartozik. Az  $L \rightarrow M$  átmenet Arrhenius-paraméterei:  $A' = 1,7 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta H = 66 \text{ kJ/mol}$ .

5. Hosszú élettartamú, kis amplitúdójú pozitív jel. Felfutása gyors, a lefutás mellett elhanyagolható, ez  $\simeq 8 \text{ ms}$  élettartamú, megfelel az  $M \rightarrow O$  átmenetnek.

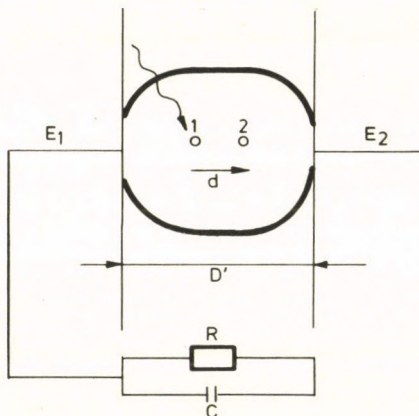
Arrhenius-paraméterek:  $A = 4 \times 10^{17} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta H = 84 \text{ kJ/mol}$ .

6. Kis amplitúdójú anya—leány típusú pozitív jel. Két időállandója megfelel az  $M \rightarrow O$  és az  $O \rightarrow bR$  átmenetnek. Az utóbbi a gyorsabb, időállandója  $\simeq 2 \text{ ms}$ . Arrhenius-paraméterek  $A' = 5,8 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta H = 54 \text{ kJ/mol}$ .

Az elektromos jeleket az  $R$  ellenálláson feszültségként regisztráljuk. Az ellenállással elosztva áramot kapunk. Ha a teljes elektromos jel negatív és pozitív áramait idő szerint integráljuk, akkor töltés dimenziójú mennyiséget kapunk. A teljes integrál pozitív, ami azt jelenti, hogy a ciklus során — a várakozásnak megfelelően — töltés halad át a molekulán. Amennyiben a  $bR$  egyes belső töltött alkotórészei mozognának csak, a ciklus követelményei alapján — tekintve, hogy az eredeti molekulának kell visszaállni — az áramok integráljának zérus értéket kell adni. Ez történik a  $\text{Na}^+$  csatornák nyitásával—zárásával együttjáró „kapu” áram esetében [27].

#### 4.2.3. Az elektromos jel értelmezése

Az elektromos jelek időállandói a fotociklus időállandóival korrelációban vannak. Az integrál pozitív, amely töltésáthaladást jelent. Lehet-e a mért jelek analíziséből további ismereteket is szerezni? Bizonyos plauzibilis feltevések mellett lehet, amelyeket a nyert adatok más módszerekkel szerzett adatokkal való összevetésével igazolhatunk.



**25. ábra.** A feltételezett elemi aktus az eltolódási áram keletkezésekor. A bR a membránba van ágyazva; a töltés 1-től 2-ig mozog;  $E_1$  és  $E_2$  feltételezett elektródok

Az első feltevésünk az, hogy egy fotociklus során egy proton mozog, és a mért eltolódási áramok a proton molekulán belüli mozgásából származnak.

Válasszunk ki egyetlen orientált pm-et, és tegyük fel, hogy a pm-hez képest nagy sík elektródák érintkeznek vele (25. ábra). A membránt homogén szigetelőnek tekintjük, amelynek dielektromos állandója  $\epsilon$ . Az abszorbeált foton — feltételezésünk szerint — egy  $Q$  elemi töltésű protont mozgat az 1-es pontból a 2-es pontba. (Megjegyezzük, hogy a tárgyalás nem változik, ha nem proton vagy nem egy proton, esetleg dipól két végén levő töltések mozognak, a  $Q$  töltés ezt is jellemezheti.) A Ramo—Shockley-teoréma szerint [61]  $i$  áram indukálódik a külső körben:

$$i(t) = \frac{Qv(t)}{\epsilon D'}, \quad (51)$$



ahol  $v(t)$  a töltés időfüggő sebessége,  $D'$  az  $E_1$  és  $E_2$  elektródok távolsága, jelen esetben a membrán vastagsága. Feltesszük, hogy  $v(t)$  nagyon nagy, vagyis a protonok mintegy ugranak az 1 és 2 pont között. (Becslések szerint egy ilyen átmenet időtartama kisebb mint  $10^{-12}$  s [62]). Az (51) egyenletet idő szerint integráljuk, akkor az indukált töltés:

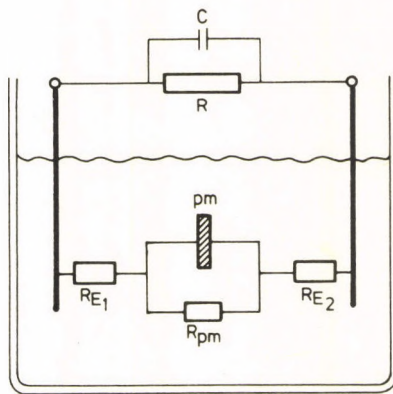
$$Q_{\text{ind}} = \int_0^{\infty} i(t) dt = \frac{Q}{\varepsilon D'} \int_0^{\infty} v(t) dt = \frac{Qd}{\varepsilon D'}. \quad (52)$$

$Q_{\text{ind}}$  arányos a  $d$  elmozdulással.  $Q_{\text{ind}}$  feltölti az elektródok és a külső mérőkör  $C$  kapacitását, amely  $R$  mérőellenálláson át sül ki. A feszültség egy töltés elmozdulás esetén

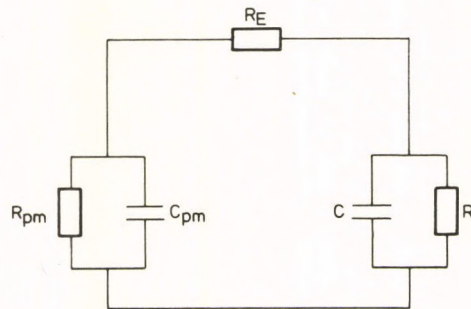
$$V_1(t) = \frac{Q_{\text{ind}}}{C} e^{-\frac{t}{RC}}. \quad (53)$$

A valós esetben az elektródok  $D$  távolságban helyezkednek el a szuszpenzióban, és  $N_0$  töltés mozog bizonyos időelosztásban. A számítások tehát két lépésből állnak: 1. meg kell határozni  $V_1(t)$  függvényt  $D$  távolságban levő valós elektródok esetén, és 2. a  $V_1(t)$  függvényeket összegezni kell  $N_0$  részecskére. Az 1. folyamatra két modellt is kidolgoztunk, az egyiket ismertettük már [63], most a második modellt fejtjük ki, amely realisztikusabb az elsőnél.

A 26. ábrán bemutatjuk a valódi és a helyettesítő elektromos kört. Egy pm-et tekintünk és abban egy bR-molekulát. A pm-et a körülvevő elektrolit  $R_{\text{pm}}$  ellenállása söntöli és  $R_{E1}$ ,  $R_{E2}$  ellenállások kapcsolják az elektródokhoz. Az ellenállások első



a)



b)

**26. ábra.** A valódi *a)* és a helyettesítő *b)* elektromos kör.  $E_1, E_2$  elektródák,  $R_{E1}, R_{E2}, R_{pm}$  az elektrolit ellenállása;  $C_{pm}$  a pm kapacitása;  $R$  és  $C$  a mérőkör ellenállása és kapacitása

közelítésében arányosak a megfelelő távolságokkal. Minthogy a  $p_m$  vastagsága,  $D'$  sokkal kisebb, mint az elektródák  $D$  távolsága, a szuszpenzió ellenállása  $R_E = R_{E1} + R_{E2}$ ,  $R_{pm}/R_E \simeq D'/D \simeq 10^{-6}$ .

A  $p_m$ -en a gerjesztés következtében megjelenő töltések az  $R_{pm}$  és  $R_E + R$  ellenállásokon át sülnek ki. A  $V_1(t)$  függvényt meghatározzuk az equivalens körre, ha  $Q_{ind}$  töltés (52. egyenlet) jelenik meg a  $C_{pm}$ -en  $t=0$  időben. Jelöljük az időfüggő töltést a  $C$  és  $C_{pm}$  kapacitáson  $Q$  és  $Q_{pm}$ -mel, az áramot az  $R$ ,  $R_E$  és  $R_{pm}$  ellenállásokon  $I$ ,  $I_E$  és  $I_{pm}$ -mel, akkor:

$$\begin{aligned} I + \dot{Q} &= I_E \\ I + \dot{Q} &= I_{pm} + \dot{Q}_{pm} \\ I_{pm} R_{pm} &= I R + I_E R_E \end{aligned} \quad (54)$$

Ezekből az egyenletekből  $I = \frac{Q}{RC}$  és  $I_{pm} = \frac{Q_{pm}}{R_{pm} C_{pm}}$  helyettesítésekkel kapjuk a következő kapcsolt differenciálegyenleteket:

$$\begin{aligned} \dot{Q} &= -Q \left( \frac{1}{RC} + \frac{1}{R_E C} \right) - Q_{pm} \frac{1}{R_E C_{pm}} \\ \dot{Q}_{pm} &= -Q \frac{1}{R_E C} - Q_{pm} \frac{1}{R_{pm} C_{pm}}. \end{aligned} \quad (55)$$

Az egyenletek megoldása  $Q$ -ra,  $Q_{pm} = Q_{ind}$  és  $Q=0$  kezdő feltételekkel ( $t=0$  időben) és néhány extrém kicsi tag elhagyásával:

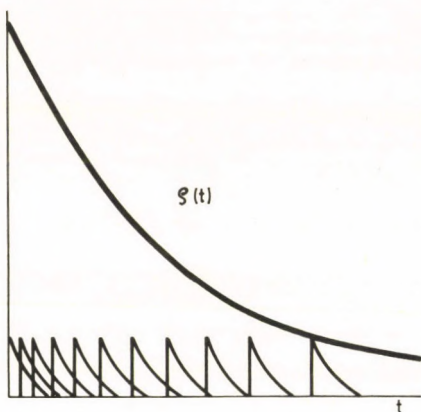
$$Q = Q_{ind} \frac{R_{pm}}{R_E} \left( e^{-\frac{t}{R'E}} - e^{-\frac{t}{R_{pm}C_{pm}}} \right), \quad (56)$$

ahol  $R' = R \frac{R_E}{R + R_E}$ . Ebből

$$V_1(t) = \frac{Q_{\text{ind}}}{C} \frac{R_{\text{pm}}}{R_E} \left( e^{-\frac{t}{R'C}} - e^{-\frac{t}{R_{\text{pm}}C_{\text{pm}}}} \right). \quad (57)$$

Az egyenletből látható, hogy  $V_1(t) = 0$ , ha  $t = 0$ , és maximuma van  $T \simeq 2R_{\text{pm}}C_{\text{pm}}$  időben. Minthogy azonban  $R_{\text{pm}}C_{\text{pm}} \ll R'C$ , ezért a második tagot elhagyhatjuk.

A következő lépésben meghatározzuk a  $V_{N_0}(t)$  függvényt, vagyis összegezzük a  $V_1(t)$  függvényeket  $N_0$  töltés mozgására. Töltés csak akkor indukálódik a külső körben, ha töltés mozog 1 pontból 2-be. Vegyünk egy egyszerű exponenciális bomlást, akkor



**27. ábra.** Minden indukált töltés  $V_1(t)$  feszültséget produkál (57. egyenlet). A megjelenés időbeli sűrűségét a  $\rho(t)$  függvény adja (58. egyenlet).  $V_{N_0}(t)$  értékét a megfelelő összegezéssel kapjuk (59. egyenlet)



az időegység alatt bomló állapotok, tehát a mozgó töltések száma

$$\rho(t) = kN_0 e^{-kt}, \quad (58)$$

ahol  $k$  a sebességi állandó.  $V_{N_0}(t)$  függvényt úgy kapjuk meg, ha minden egyes töltés mozgásához tartozó  $V_1(t)$  függvény járulékait összegezzük  $t$  időben minden  $t' < t$  értékre (27. ábra). Számításban ez az (57) és (58) egyenlet konvolúcióját jelenti:

$$\begin{aligned} V_{N_0}(t) &= N_0 \frac{Q_{\text{ind}}}{C} \frac{R_{\text{pm}}}{R_E} k \int_0^t e^{-kt'} e^{-\frac{t-t'}{R'C}} dt' = \\ &= N_0 Q_{\text{ind}} \frac{R_{\text{pm}}}{R_E} \cdot \frac{kR'}{1 - kR'C} \left( e^{-kt} - e^{-\frac{t}{R'C}} \right). \end{aligned} \quad (59)$$

Az egyenlet két szélső esetét érdemes vizsgálni. Ha

$$k \gg \frac{1}{R'C}, \text{ akkor}$$

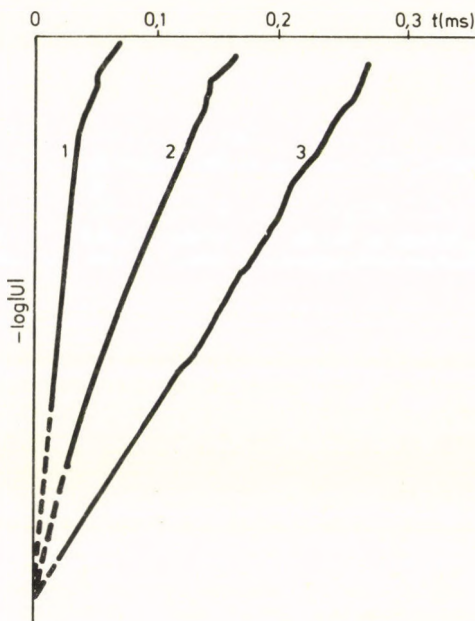
$$V_{N_0}(t) = \frac{N_0 Q_{\text{ind}}}{C} \frac{R_{\text{pm}}}{R_E} e^{-\frac{t}{R'C}}, \quad (60)$$

vagyis nem függ a bomlás időállandójától, csak az elektromos körétől. Az amplitúdót a mérőkapacitás határozza meg, és nem függ a mérő ellenállástól. Ha

$$k \ll \frac{1}{R'C}, \text{ akkor}$$

$$V_{N_0}(t) = N_0 Q_{\text{ind}} R' \frac{R_{\text{pm}}}{R_E} k e^{-kt}. \quad (61)$$

Itt a mérőkör időállandója esik ki, a jel követi a bomlás időállandóját, és amplitúdója függ a mérőellenállástól. A bR méréseknél szobahőmérsékleten a



**28. ábra.** Az elektromos jel függése a terhelő ellenállástól. A jel amplitúdó logaritmus ( $U$ ) 80 K hőmérsékleten 1:  $R = 10 \text{ k}\Omega$ ; 2:  $R = 50 \text{ k}\Omega$ ; 3:  $R = 100 \text{ k}\Omega$

$bR \rightarrow K' \rightarrow K$  átmeneteket a (60), az  $L \rightarrow M \rightarrow O \rightarrow bR$  átmeneteket a (61) formulával jól leírhatjuk. A  $K \rightarrow L$  átmenet időállandója nem sorolható egyik kategóriába sem, de  $5^\circ\text{C}$ -ra hűtve már a (61) összefüggés jól alkalmazható (18. ábra). A két közelítés helyességét jól igazolják a  $bR \rightarrow K'$  és  $K' \rightarrow K$  átmenetekhez tartozó elektromos jelek szétválasztása érdekében végzett mérések (23. és 28. ábra).

A  $bR$  bomlásában több komponens van. Akkor a (61) egyenlet időfüggő része módosul és az egyszerű

exponenciális bomlás függvény helyett a (4), (5) és (6) egyenletekben megadott függvényeket kell használnunk. Vizsgáljuk az  $i$ -edik átmenethez tartozó  $V_{N_0}(t)$  függvényt, és jelöljük az ehhez tartozó időfüggést  $f(k_1, k_2, \dots, k_i, t)$ -val. Akkor a  $k_i \ll \frac{1}{R'C}$  közelítésben

$$V_{N_0}^{(i)}(t) = N_0 \frac{Q d_i}{\varepsilon_i D'} \frac{R_{pm}}{R_E} k_i f(k_1, k_2, \dots, k_i, t). \quad (62)$$

Itt  $\varepsilon_i$  jelzi az  $i$ -edik átmenethez tartozó fehérjén belüli dielektromos állandót. A gyakorlatban az „ $f$ ” függvéynél csak két tagot kell figyelembe vennünk a  $bR$  fotociklusánál, mert az időállandók nagyon különbözőek. Mondottuk, hogy  $\frac{R_{pm}}{R_E}$  nagyságrendben  $\frac{D'}{D}$ -vel egyezik. Legyen  $\frac{R_{pm}}{R_E} = F \frac{D'}{D}$ , és jelöljük  $A$ -val a teljes orientálástól való esetleges eltérést. Akkor

$$V_{N_0}^{(i)}(t) = N_0 Q R' \frac{d_i}{D} \frac{k_i}{\varepsilon_i} F A f(k_1, k_2, \dots, k_i, t). \quad (63)$$

Tegyük fel, hogy a fehérjéken belül a dielektromos állandó mindenütt azonos:  $\varepsilon_i = \varepsilon \simeq 2$ , akkor a (63) egyenletből  $Q \cdot d_i \cdot F \cdot A$  mennyiségek meghatározhatók, mert  $N_0$ -t az  $M$  állapot koncentrációjának mérésével (26, 27. egyenlet), az időállandókat az elektromos jelek időállandóiból meghatározhatjuk. Telítési orientáció esetén  $A \simeq 1$ , feltevésünk, hogy egy proton mozog ciklusonként, akkor  $Q = 1,6 \times 10^{-19}$  C, azaz egy elemi töltés.  $F = 4$  választással kapunk olyan  $d_i$  értékeket, amelyekre  $\sum d_i = 5$  nm, a

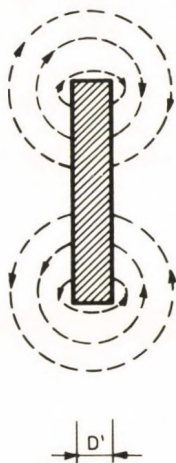
### 3. Táblázat

#### AZ ELEKTROMOS JELEKBŐL A SZÖVEGBEN KÖZÖLT FELTEVÉSEK ALAPJÁN SZÁMÍTOTT ELMOZDULÁSOK

Átmenet	Elmozdulás, (nm)	
$bR \rightarrow K' \rightarrow K$	$\begin{Bmatrix} d_1 \\ d_2 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} -0,02 \\ -0,11 \end{Bmatrix}$
$K \rightarrow L$	$d_3$	-0,02
$L \rightarrow M$	$d_4$	0,5
$M \rightarrow O$	$d_5$	3,1
$O \rightarrow bR$	$d_6$	1,5
	$\Sigma d_i$	4,95

membrán vastagsága. Itt az első két elektromos jelhez számítható elmozdulást célszerűségi okokból külön tárgyaljuk, jóllehet azokat — mint már említettük — nagy valószínűséggel egyetlen töltéselmozdulás okozza. Az adatokat a 3. táblázat tartalmazza. Az  $F=4$  érték könnyen értelmezhető, ha figyelembe vesszük, hogy a membránon létesített töltéseknek  $\Sigma d_i$ -nél hosszabb útvonalon kell kiegyenlítődniük (29. ábra).  $R_{pm}$ -et elvben meg lehet határozni számítással, de közben határozott integrálokat kell kiszámítani a divergenciához egész közeli határértékekkel. Ez az eredményeket irreálissá teszi. Meg kell elégednünk azzal az egyáltalán nem lebecsülendő eredménnyel, hogy a (63) egyenlet segítségével a mérési eredményekből  $\Sigma d_i$ -re nagyságrendben helyes értéket kapunk. Ha  $\Sigma d_i$  értékét az





**29. ábra.** A töltéskiegyenlítődés útja a pm körül

ismert membránvastagságra normáljuk, akkor pedig az egyes  $d_i$  értékeket kapjuk meg.

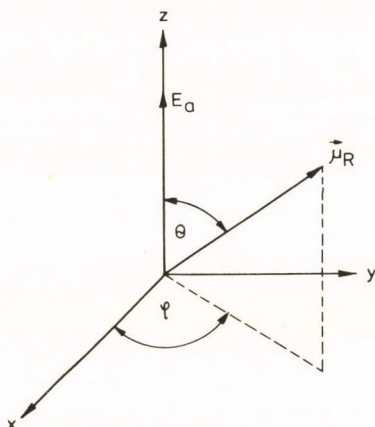
#### 4.2.4. Az elmozdulás mértékének analízise

Az elektromos jelek mérése és az elmélet nem ad választ arra, hogy milyen töltés mozog a fehérjén belül. Feltételeztük a proton mozgását, mert ismerjük, hogy fotociklusonként egy (vagy esetleg több) proton átjut a membránon. Ezzel teljes összhangban van az, hogy az elmozdulások algebrai összege pozitív, és nagyságrendben egyezik a membrán vastagságával.

További problémát jelent, hogy az UV spektrum változások tanulságai szerint a protontranszport-

ban részt vevő töltött oldalláncok mozgása mily mértékben befolyásolja az egyes  $d_i$  értékeket. Mint-hogy az oldalláncok mozgása ciklikus kell legyen, azt várhatjuk, hogy azok párosával pozitív és negatív vagy fordított járulékot adnak az elektromos jel egyes komponenseihez. Vegyük példának a tirozin oldalláncot. A tirozin abszorpciós jel az  $L \rightarrow M$  átmenet során jelenik meg, és az  $M \rightarrow O$  átmenettel tűnik el. Ha pl. a mozgás az első átmenetben a membrán külső oldala felé irányulna  $d_4$  elmozdulás a proton és oldallánc töltése mozgásának összege lenne. Tehát a valódi protonelmozdulás kisebb, mint a 3. táblázatban adott érték.  $d_5$ -höz az oldallánc mozgás negatív járulékot adna, tehát protonmozgás annyival lenne nagyobb, amennyivel az  $L \rightarrow M$  mozgás kisebb. Minthogy az oldallánc mozgás irányáról nincs ismeretünk, a fordított effektus is lehetséges.

Az oldalláncok mozgásáról azonban ismereteket szerezhethetünk a fotoszelekció módszerével. Szuszpenzióban levő bR-molekulákat lineárisan poláris lézer fényimpulzussal gerjesztjük, így kiválasztjuk azokat a molekulákat, amelyeknek az átmeneti dipólnyomatéka a polarizációs sík irányába esik. (A kiválasztás nem teljes, a valószínűség eloszlás  $\cos^2 \Theta$ -val arányos, ahol  $\Theta$  a szög a polarizáció síkja és a bR-molekula átmeneti dipólnyomatéka között (lásd 30. ábra). Ha az abszorpcióváltozásokat a lézer fény síkjával párhuzamos és arra merőlegesen polarizált mérőfényvel regisztráljuk, akkor különböző értékeket kapunk ( $\Delta A^{\parallel}$  és  $\Delta A^{\perp}$ ). A 31a ábrán bemutatjuk a  $\lambda = 410$  nm mérőfényvel kapott



**30. ábra.** Az átmeneti dipólnyomaték ( $\mu_R$  a retinál kromofórja) és a lézer fény polarizációs síkja közti  $\Theta$  szög. A  $\phi$  szögre átlagol a fotoszelekciós módszer

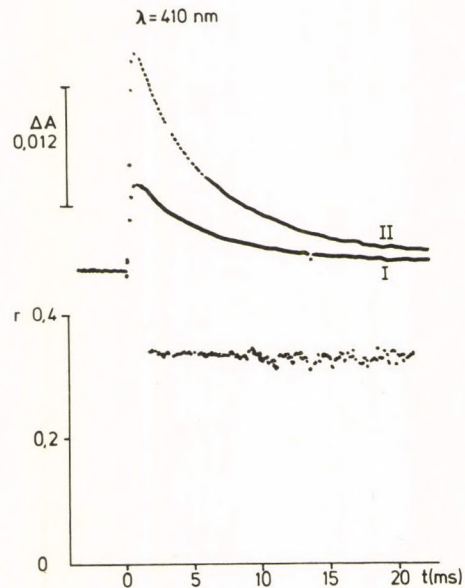
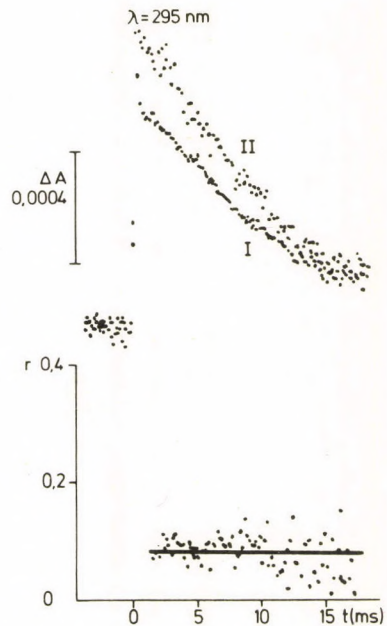
eredményeket [32]. A mérési adatokból képezhetjük az ún. anizotrópia faktort

$$r(t) = \frac{\Delta A^{\parallel}(t) - \Delta A^{\perp}(t)}{\Delta A^{\parallel}(t) + 2\Delta A^{\perp}(t)}. \quad (64)$$

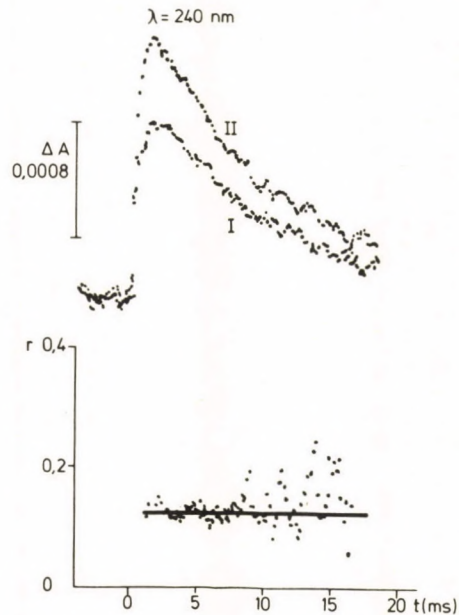
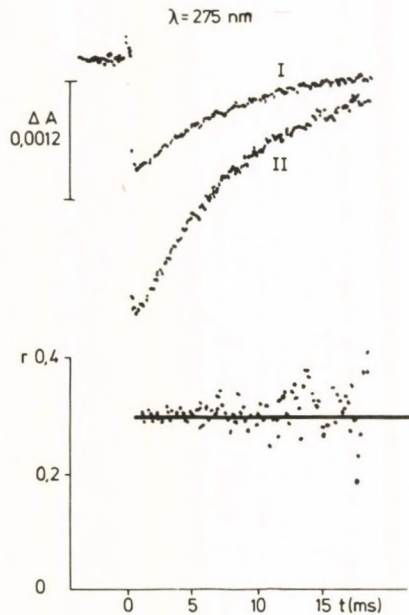
Az anizotrópia faktor  $t=0$  időben jellemző arra a  $\delta$  szögre, amelyet a vizsgált kromofór (az újonnan megjelenő forma átmeneti dipólnyomatéka) a gerjesztett dipólnyomatékkal bezár:

$$r(0) = \frac{1}{5}(2 - 3 \sin^2 \delta). \quad (65)$$

Ha  $\delta=0$ ,  $r(0)=0,4$ . Ezt az értéket csak akkor kapjuk meg, ha kis gerjesztő fényintenzitással mérünk.







31. ábra. Az abszorpcióváltozások kinetikája, és a számított anizotrópia faktor  $r(t)$  agar-agar gélben immobilizált pm-eken

#### 4. Táblázat

A  $t=0$  IDŐHÖZ TARTOZÓ  $r$  ANIZOTRÓPIA ÉRTÉKEK  
KÜLÖNBÖZŐ HULLÁMHOSSZAKON KIS GERJESZTŐ  
FÉNYINTENZITÁS ESETÉN

$\lambda$ (nm)	$r(t=0)$
550	0,35
410	0,38
295	0,16
275	0,37
240	0,22

Ilyen  $r(0)$  értékeket mutatunk be a 4. táblázatban [32]. Az 550 nm-en mért érték a bR alapállapotának a visszatértét jelzi, tehát ideális körülmények között  $\delta=0$ -ra jellemző  $r(0)=0,4$  értéket kell kapnunk. Az  $r(0)=0,35$  ezt jól közelíti.

Az  $M$  formát jellemző 410 nm-en mért  $r(0)=0,38$  érték azt mutatja, hogy a retinál kromofór iránya nem változott meg, csak a színe. Az UV tartományban végzett mérések mutatják, hogy a  $\lambda=275$  nm-nél jelentkező triptofán kromofór jó közelítéssel párhuzamos a retinál kromofórral. Ez mindjárt azt is valószínűsíti, hogy az abszorpcióváltozás egyetlen triptofánmolekulától származik. Ez megegyezik HESS és KUSCHMITZ eredményével [30].  $\lambda=295$  nm-nél triptofán és tirozin együttes jele,  $\lambda=240$  nm-nél a tirozin jele látszik nagy valószínűséggel. Itt, mint-hogy  $r(0)$  kicsi, nem sokat tudunk következtetni.

A különböző hullámhosszakon mért  $r(t)$  függvényeket a 31. ábrán mutatjuk be. Mindegyiken látszik, hogy az anizotrópia faktor időtől független

konstans érték. Ez csak úgy lehetséges, ha a kromofórok iránya nem változik az idő alatt, amíg az új állapotban vannak. Ez a kijelentés nem jelenti azonban általában azt is, hogy a kromofórok iránya nem változhat ugrásszerűen, mikor megjelennek vagy eltűnnek. További analízissel az átmenetekkel kapcsolatos változásokról is kaphatunk felvilágosításokat.

A legegyszerűbb a helyzet a retinál kromofór esetében. Láttuk, hogy az *M* állapot kromofórjának iránya *bR* alapállapotí kromofór irányával egyezik. Minthogy ugyanaz a kromofór jelenik meg az *M* formában kissé megváltozott színnel, de azonos iránnyal, állíthatjuk, hogy a retinál iránya nem változik meg az átmenetek során sem. (EL SAYED et al. [64] jelezte hogy a *K* állapothoz tartozó kromofór esetében is  $\delta=0$  értéket talált.) Az UV kromofórok esetében az analízis sokkal bonyolultabb. Az analízist egyelőre csak a triptofán kromofór viszonylag tiszta esetére sikerült elvégezni. Ebből azt kapjuk, hogy a mérések alapján a kromofór elfordulási szöge az átmenet alatt nem lehet nagyobb, mint  $18^\circ$ . A triptofán oldalláncának hossza  $\sim 0,6$  nm,  $18^\circ$ -os elfordulás esetén a legtávolabbi pont  $0,18$  nm-et mozdul el. Ez lehet a maximális járulék az elmozdulásokhoz, de akkor egy töltésnek kell mozdulni az oldallánccal, és a mozgásnak pontosan a membrán normálisának irányába kell esni. A triptofán oldallánca nem töltött, és a szokásos pH értéken nem disszociál le róla töltés.

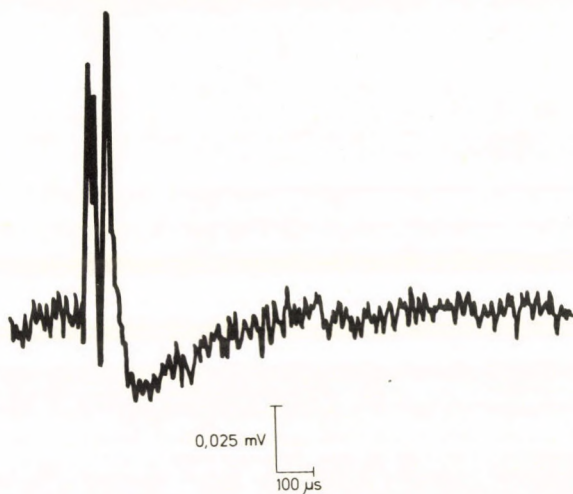
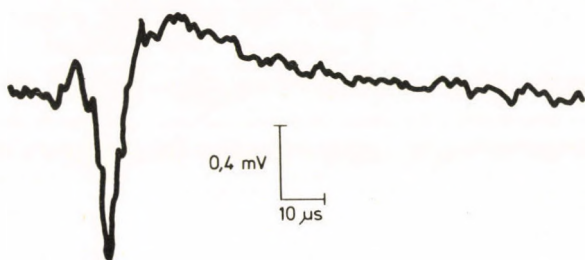
A tirozin oldallánca  $\sim 0,7$  nm, ez töltött lehet, ha egy proton disszociál róla. Ha a töltés a legtávolabbi

ponton van,  $90^\circ$ -os elfordulás esetén, ami nagyon valószínűtlen,  $\sim 0,7$  nm mozgás lehet maximálisan, ami kicsi a 3 nm-hez képest. Hogy lényegesebb hozzájárulást kapjunk, ahhoz több tirozin részvétele lenne szükséges. Ezt az eddigiek alapján (UV abszorpció, fotoszelekció) nem lehet egyértelműen kizárni, de egy kísérletünk arra mutat, hogy egy tirozin vesz csak részt a bR protonpumpáló funkciójában.

A kísérletben [65] az elektromos jeleket olyan pm-eken mértük, amelyekben a bR tirozin oldalláncához jódot kötöttünk. Azt találtuk, hogy a protonmozgásban nincs változás az *M* állapotig, onnan azonban a protonok nem haladnak tovább előre, hanem visszaugranak az eredeti helyükre. A ciklus tehát nem jár protonemisszióval, a töltések a fehérjén belül mozognak csak. A következtetést a 32. ábrán látható elektromos jelek alapján vonjuk le. Az elektromos jel első komponensei (a negatív komponens és az  $L \rightarrow M$  átmenetre jellemző pozitív komponens) nem változnak, az  $M \rightarrow O$  és  $O \rightarrow \text{bR}$ -re jellemző pozitív komponensek helyett egy a fotociklus időállandóitól különböző időállandójú negatív komponens jelenik meg (32. ábra). A pozitív és negatív jelek területe megegyezik.

A méréseket két különböző módon jódozott mintán is elvégeztük. Az egyikben egy, a másikban két tirozin volt módosítva. Az elektromos jelek azonos eseményeket jeleztek, vagyis egy tirozin módosítása már elegendő volt a protonemisszió megszüntetéséhez.





**32. ábra.** Elektromos jelek tirozin módosított pm-eken különböző erősítéssel és időfelbontással

Jóllehet, más oldalláncok mozgását nem vizsgáltuk, a fentiek alapján mégis valószínűsíthetjük azt a feltevést, hogy az oldalláncok mozgása erősen korlátozott a bR-ben, következésképpen a töltött

oldalláncok mozgása elhanyagolható mértékben változtatja meg a  $d_i$  elmozdulás értékeket.

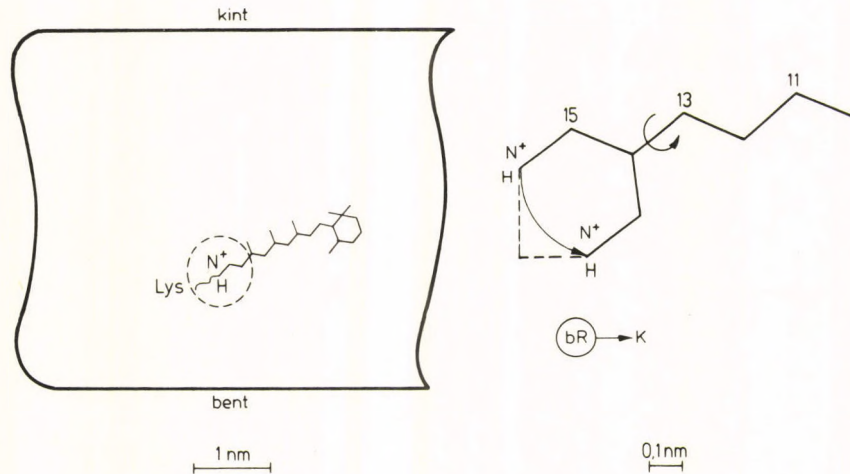
Az oldalláncok nagyon kis mozgásáról alkotott képet megerősítik a fehérjékre vonatkozó egyéb vizsgálatok is. FRAUENFELDER et al. [21] röntgendiffrakció vizsgálatok során azt találták, hogy a mioglobbin fehérje különböző atomjai különböző amplitúdóval rezegnek, de az átlagos elmozdulás négyzete nem nagyobb, mint  $0,5 \times 10^{-3} \text{ nm}^2$ . Ezt egyéb vizsgálatok is megerősítik [66].

Több fehérjének ismeretes a kristályszerkezete alapállapotban és abban az állapotban, amelyben a szubsztrát kötve van, vagy pl. redukált és oxidált állapotban [67]. A szerkezet a két állapotban csak nagyon kicsit különbözik, azaz a működésre jellemző két végállapot atomjainak helyzete közel azonos.

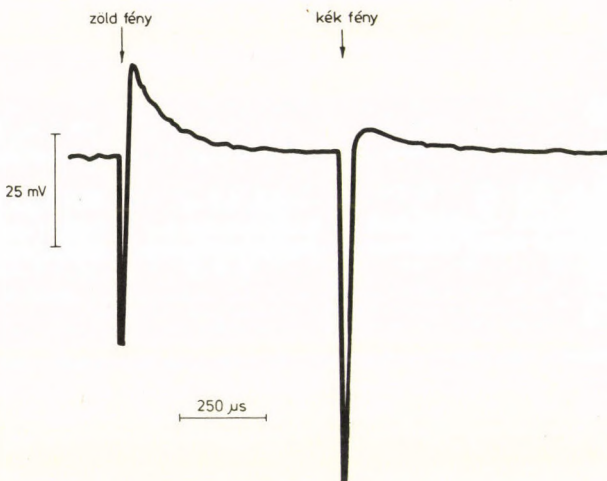
Nem valószínű, hogy az átmenetkor nagy mozgások történének a fehérjében, amit az is alátámaszt, hogy az enzimek kristályokban is elvégzik katalitikus funkciójukat a szubsztrátokon, és nem esnek szét a kristályok, jóllehet, intenzív mozgásoknál ezt várnánk.

Ezek után vizsgáljuk meg, hogy a mérésekből a 4.2.3. részben leírt elmélet alapján számított  $d_i$  értékek (3. táblázat) összhangban vannak-e más módszerekkel nyert adatokkal.

a) Nagyon valószínű, hogy a  $bR \rightarrow K' \rightarrow K$  átmenet az *all-transz*-retinál a 13-*cisz*-izomerizációját involválja [68]. A *transz-cisz* izomerizáció egyszerű geometriájából (33. ábra) a Schiff-bázishoz rögzített protonnak 0,16 nm-et kell elmozdulnia a membrán



33. ábra. A *transz-cisz* izomerizáció geometriája. A retinál a membrán merőlegesével 70°-os szöget zár be



**34. ábra.** Elektromos jelek orientált pm szuszpenzióban zöld és az *M* állapot kialakulása után adott kék fényimpulzus hatására

normális irányában.  $d_1 + d_2 = 0,13$  nm ehhez nagyon közeli érték.

b) Az elmozdulásértékek jól meghatározzák az átpumpált proton eredetét, azaz a Schiff-bázist. A Schiff-bázis  $d_6 = 1,5$  nm távolságban van a belső felülettől, és  $-(d_1 + d_2 + d_3) + d_4 + d_5 = 3,45$  nm-re a külső felülettől. A szerkezeti meghatározások alapján ezen a helyen várjuk a Schiff-bázist [7, 8].

c) Ismeretes, hogy a bR nem pumpál protont, ha *M* állapotban kék fénnel megvilágítjuk [69, 70], vagyis kék fény hatására a bR fotociklus közvetlenül zárul a molekulán belül. Az elektromos jeleket vizsgálva [56] azt tapasztaljuk, hogy zöld fényimpulzussal elindítva a fotociklust az elektromos jelek



a szokásos módon (17. ábra) következnek egymás után, de kék fényimpulzus nagy negatív elektromos jelet indukál (34. ábra). A (63) egyenlet alapján elvégzett értékelés azt mutatja, hogy a zöld és kék fény hatására történt elmozdulások algebrai összege zérus. Itt kék fénnel hajtottuk vissza a protonokat a Schiff-bázisra, ami a tirozin módosított mintában spontán is bekövetkezett.

### *4.3. A protonpumpa modellje*

Az optikai (látható UV, lézer-, Raman- és infravörös) spektroszkópia, valamint az elektromos jelek adatai módot nyújtanak arra, hogy egy modellt konstruáljunk a bR protonpumpa működéséhez. A modelltől azt várjuk, hogy lehetőleg értelmezze a különböző módszerekkel nyert adatokat, és főleg, hogy számot adjon a foton energia bR-molekulán belül bekövetkező befogásáról, tárolásáról és arról, hogy a tárolt energia hogyan alakul át a protonok egyenirányú mozgásává.

Az első vállalkozás STOECKENIUSTól származik [71]. A lényege nagyon egyszerű: a Schiff-bázis és a membrán két oldala között egy-egy protonvezetőt tételez fel, amelyeken a protonok szabadon mozoghatnak. (A protonvezetőről később lesz szó.) A vezetőkét egy energetikai kapcsoló választja szét. A belső vezetőről csak akkor jut át proton a külső oldal felé irányuló protonvezetőre, ha az abszorbeált foton energiája azt átemeli az energiarésen. A továbbiakban látni fogjuk, hogy ma már ennél

lényegesen részletesebb modellt is szerkeszthetünk, amely valószínűleg sokkal jobban megközelíti a valóságot.

#### 4.3.1. A *transz-cisz* izomerizáció; energiaátalakítás és tárolás

Már említettük a 4.2.4. részben, hogy a  $bR \rightarrow K' \rightarrow K$  átmenet alatt *transz-cisz* izomerizáció jön létre. A *transz-cisz* izomerizációt elsősorban optikai, spektroszkópiai vizsgálatok igazolják. Ezek közül első helyen említjük a lézer-Raman és infravörös spektroszkópiai munkákat [33, 34, 35]. Itt részletesebben tárgyaljuk a 4.2.2. részben már említett, a  $K'$  állapot létezésére vonatkozó érveket.

80 K hőmérsékleten megvilágítva a mintákat, a fotociklus elindul és megáll a  $K(?)$  állapotnál. A kapott spektrumot összehasonlítják a 13-*cisz* spektrummal. (A 13-*cisz* spektrumot úgy lehet megkapni, hogy a sötét adaptált  $bR$  spektrumából pontról pontra kivonjuk a fényadaptált spektrum felét.) Az összehasonlításból az derül ki, hogy a 80 K hőmérsékleten, megvilágításra kialakuló spektrum hasonlít a 13-*cisz* spektrumhoz, de *csak* hasonlít, jó néhány új vonal is kialakul, megjelenik. A kialakuló állapotot ezért torzított 13-*cisz* állapotnak nevezik, amely a hőmérséklet növekedésével valódi 13-*cisz* spektrummá relaxál. A relaxált spektrumot szobahőmérsékleten a gerjesztés után mintegy 60 ns-mal figyelték meg [60, 72].

Hasonlóan a sötét adaptált 13-*cisz* spektrumával való összehasonlítás alapján állítja KUSCHMITZ és

HESS [31], hogy egy torzított 13-*cisz*-re jellemző UV és látható tartományba eső változás lép fel a megvilágítás után azonnal, amely 0,5—1  $\mu$ s alatt relaxál 273 K hőmérsékleten a valódi 13-*cisz*-re jellemző spektrumba.

A fentiekből és az elektromos jelek két lépéséből arra következtetünk, hogy a *transz-cisz* izomerizáció két lépésben történik, vagyis egy  $K'$  állapotot kell iktatnunk a  $K$  állapot elé. A  $K$  állapot tehát 13-*cisz* állapot. HONIG et al. [68] és függetlenül WARSHEL [73] vetették fel, hogy a fotonenergia a *transz-cisz* átmenet során elektrosztatikus energiává alakul át és stabilizálódik. A bR alapállapotában a Schiff-bázis pozitív töltését egy közel levő negatív töltés (pl. egy aminosav karboxilcsoportot tartalmazó oldalláncán levő negatív töltés) kompenzálja. Legyen a távolság két töltés között  $r_0 \simeq 0,2$  nm (33. ábra). Az elektrosztatikus energiaváltozás, ha a töltés  $r$ -távolságra mozdul el:

$$\Delta E_s = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \left( \frac{1}{r_0} - \frac{1}{r} \right), \quad (66)$$

ahol  $\epsilon_0$  a vákuum dielektromos állandója ( $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12}$ ),  $r$  a geometria alapján számítható új távolság,  $\epsilon = 2$ . Eredményül azt kapjuk, hogy az 570 nm hullámhosszú foton energiájának mintegy 75%-a átalakul elektrosztatikus energiává és addig ilyen értékben tárolódik is, amíg a proton nem mozdul el a Schiff-bázisról. HONIG és WARSHEL a töltéselmozdulást a *transz-cisz* izomerizáció alapján posztulálták. Vizsgálataink ezt a töltéselmozdulás tényleges megfigyelése alapján megerősítették, de egyúttal



problémaként fel is vetették a kétlépcsős töltésmozgás értelmezését.

A bR retinálja *transz-cisz* izomerizációjának kvantumkémiai tárgyalása során SCHULTEN [74, 75, 76] arra a következtetésre jutott, hogy a *transz-cisz* izomerizáció első lépésében a proton elugrik a Schiff-bázisról a 13—14 szénatom lekötése közelébe, ezzel lecsökkenti az izomerizációval szembenálló szterikus akadályt jelentő barrier nagyságát, és így teszi lehetővé a nagy térbeli mozgást igénylő izomerizációt. A második lépés aktivációs entalpiáját  $\sim 60$  kJ/mól-ra becsülte a kvantumkémiai számítások alapján.

A Schulten-modell azonban ellentmondásban van a lézer-Raman és infravörös mérésekkel, amelyek szerint a *cisz* forma — jóllehet torzított *cisz* forma — már az első lépésben kialakul [34, 35], és amelyek nagymértékben valószínűsítik, hogy a proton nem mozdul el [34] a Schiff-bázisról.

Az elektromos jelek arra utalnak, hogy a  $K'$  kialakulása már nagy töltésmozdulással jár, a  $K' \rightarrow K$  átmenetbe a töltésmozgás elhanyagolható. Valószínű, hogy az elektromos jelek nem értelmezhetők a Schulten-modell alapján.

#### 4.3.2. A protonok mozgása

A protonok elmozdulását két csoportra oszthatjuk:

1. kis elmozdulások ( $d_1 + d_2, d_3, d_4$ ),
2. nagy elmozdulások ( $d_5, d_6$ ).

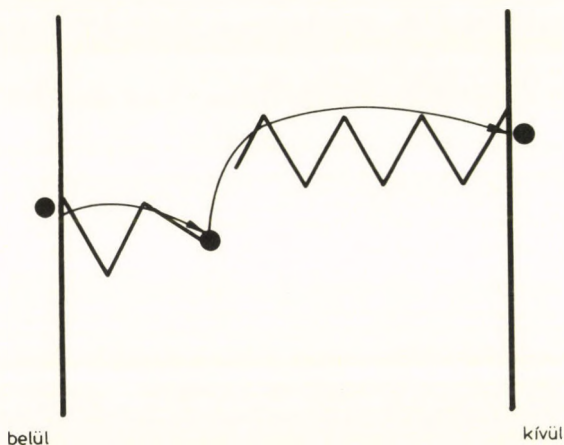


Minthogy eddigi ismereteink szerint az elmozduló protonok a Schiff-bázisból erednek (láttuk, hogy  $d_1 + d_2$  a *transz-cisz* izomerizációval kapcsolatos) egyszerű belátni, hogy az 1. csoport a fehérje mélyében létrejövő mozgásokat tartalmazza, ezeket *belső mozgásoknak* nevezzük. A 2. csoportban  $d_5$  elmozdulás viszi a protonokat a felszínre, és  $d_6$  elmozdulás során lépnek a protonok be a membrán belső oldaláról. A  $d_5$  és  $d_6$  elmozdulásokat — minthogy a fehérje külvilágával érintkeznek — *külső mozgásoknak* nevezzük.

Láttuk, hogy a belső elmozdulások közül  $d_1$  és  $d_2$  a retinál mozgásával kapcsolatos, a proton a Schiff-bázishoz kötve mozog. A  $K \rightarrow L$  átmenetnek megfelelő  $d_3$  elmozdulás nagyon kicsi, valószínű, a  $K$  állapotban még meglevő mechanikus feszültségek relaxációjának felel meg.

Az  $L \rightarrow M$  átmenet  $\sim 0,5$  nm. Tudjuk, hogy az  $M$  állapotban a Schiff-bázis deprotonált, tehát a proton elmozdult onnan, nyilvánvaló, egy közelben levő negatív  $\text{COO}^-$ -csoport kötötte meg időlegesen. EISENSTEIN és munkatársai infravörös spektroszkópia segítségével észlelték is, hogy egy  $\text{COO}^-$ -csoport protonálódik az  $M$  állapotban [36]. Elképzelhető, hogy a protonok 0,5 nm távolságra egyszerűen átugranak.

A módosított bR-ben és a kék fény hatására megfigyelt zárt töltésmozgás ciklus jól értelmezhető a belső átmenetek koncepciója alapján. Ezekben az esetekben a proton egyáltalán nem jut ki a molekulából. A módosított tirozint tartalmazó bR mutatja, hogy valamilyen formában részt vesz a tirozin a

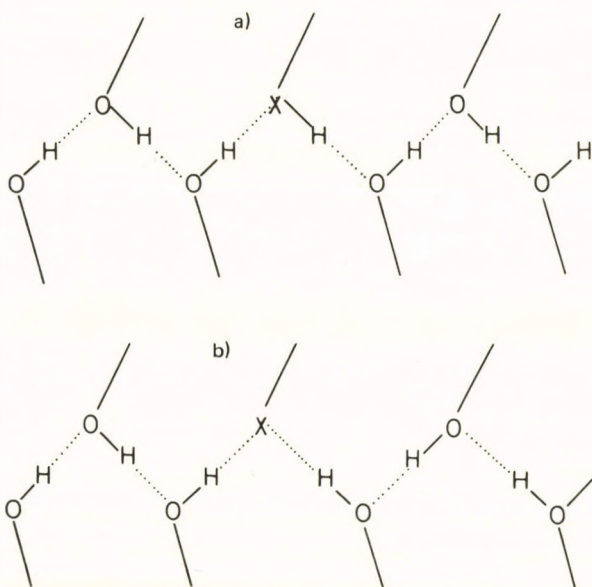


**35. ábra.** A protonpumpa kapcsoló modellje. A Schiff-bázistól a membrán két oldala felé egy-egy protonvezető található. A kapcsolót a foton energiája zárja

külső mozgás létrejöttében, a kék fény pedig az  $M$  állapotból egyszerűen visszahajtja a protont a Schiff-bázisra, és létrehozza a *cisz-transz* izomerizációt.

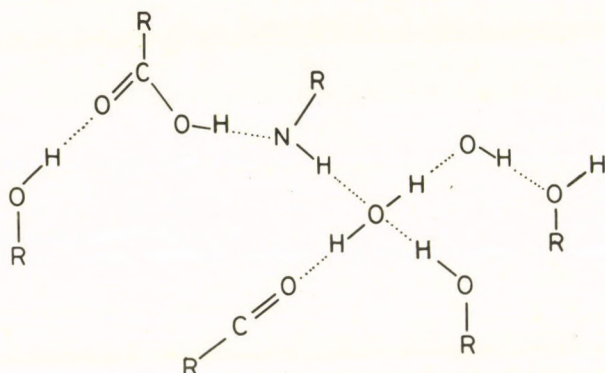
A külső átmenetek esetében az elmozdulás  $d_5 \simeq 3,1$  nm, és  $d_6 \simeq 1,5$ . A protonok ilyen nagy távolságot bizonyára nem tudnak egy lépésben megtenni. A külső átmenethez valamilyen „proton vezetőre” van szükség, ahogy azt a Stoeckenius-modell helyesen állította (35. ábra). (Megjegyezzük, hogy ismerve azt, hogy a protonmozgás több lépésben valósul meg, a kapcsoló modellt többszörös kapcsoló modellé módosíthatjuk. Minden elmozdulásnak megfelel egy kapcsolás ebben a képben.)

A „proton vezető” egy lehetséges modelljét NAGLE és munkatársai dolgozták ki [77, 78]. A jégben a



**36. ábra.** Protonvezetés hidrogénen keresztül kötött láncokon. (Pl. jégben.) *a)* Az első lépésben az ion mozog, *b)* ezt követi a hibahely mozgása. A tiszta eredmény egy proton elmozdulása az *X* perturbációs helyről.  $H^+$  helyét a másik oldalról hasonló mechanizmus tölti fel, és ekkor helyreáll a lánc eredeti állapota

víz-molekulák hidrogénen keresztül kötött láncokat alkotnak, az elektromos vezetés a láncok mentén alakul ki. A mozgás két nagy folyamatban, mindegyikben apró lépésekben történik (36. ábra). NAGLE elméleti becslést is adott a mozgásokhoz szükséges időre: az ionnak néhány ns-ra van szüksége, hogy 5 nm-et mozogjon ilyen láncon, a hibák mozgása néhány  $\mu s$ -ot vesz igénybe.



37. ábra. Fehérje oldalláncokból kialakuló hidrogén kötött láncok

A bR fehérje nem jég, de az oldalláncok megfelelő elrendezésben kialakíthatnak hidrogén kötött láncokat (37. ábra).

Az elvi lehetőség igazolása csak akkor lehetséges, ha a bR fehérje 3-dimenziós szerkezete ismertté válik. A külső mozgásokat tehát úgy értelmezhetjük, hogy pl. a proton az *M* állapot barrierjén átjutva a „proton vezetőbe” jut, ahonnan összességében néhány  $\mu$ s idejű töltésmozgás révén teljes egészében kijut a fehérje felszínére. A mozgás néhány  $\mu$ s-os ideje még mindig nagyon gyors a barrier időállandójához képest, ezért az (52) egyenletben használt közelítés érvényes. A véges protonsebesség kérdését részletesebben is tárgyaltuk [79], amikor is kimutattuk, hogy ha a láncban a mozgás  $\sim 1$  ms-nél gyorsabb, akkor már nem kapunk változást a mért elektromos jelben. A becslés ennél 3 nagyságrenddel gyorsabb



mozgást jelent, tehát egyelőre nincs kísérleti lehetőség igazolására, és a kétféle töltésmozgás (ion és hiba) jeleinek szétválasztására.

Egy fontos kísérletünk alapján alternatív modellt dolgoztunk ki a protonvezetésre [80, 81]. A pm-ek elektromos térben nemcsak orientálódnak, hanem elektroforetikusan mozognak is. Ilyen módon elérhető, hogy egy vezető felületre vizes szuszpenzióból orientáltan lerakódnak [82]. Megszáritva, a minta évekig működőképes állapotban marad. A mintán végzett elektromos és abszorpciós jel mérések tapasztalatait (38. ábra) a következőkben foglaljuk össze:

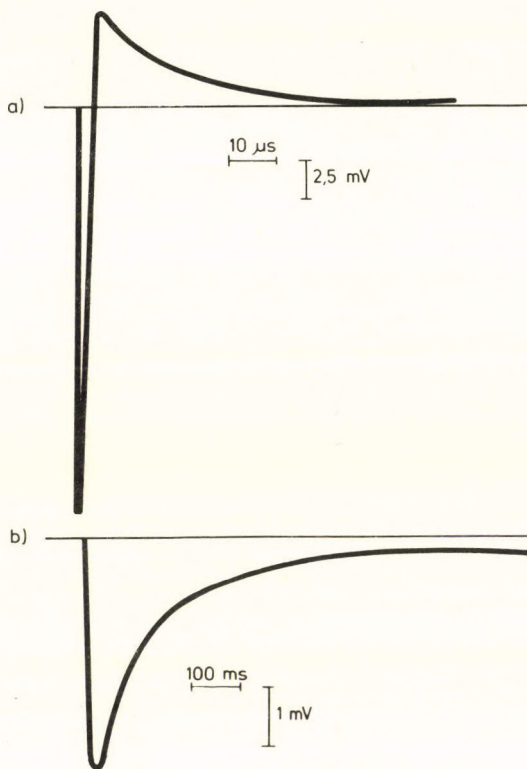
a) A belső átmenetek időállandói  $K \rightarrow L$ ,  $L \rightarrow M$ ) felgyorsulnak a vizes szuszpenzióhoz képest.

b) A külső átmenetek hiányoznak, pozitív jel helyett negatívot kapunk. Az 5. táblázatban a

### 5. Táblázat

AZ ELEKTROMOS JELEK TERÜLETÉNEK ARÁNYA  
(ABSZOLÚT ÉRTÉKBEN)  $M \rightarrow bR(S_3)$  ÉS  $L \rightarrow M(S_2)$   
ÁTMENETEKRE A MINTA RELATÍV  
NEDVESSÉGTARTALMÁNAK ( $P/P_0$ ) FÜGGVÉNYÉBEN

$P/P_0$	$S_3/S_2$
0	0,68
0,12	0,68
0,22	0,84
0,33	0,86
0,51	0,61
0,75	0,47
0,85	0,1
1	0,0036



**38. ábra.** Tipikus elektromos jelek száritott, orientált pm mintákon. a) belső átmenetek; b) a lassú átmenet negatív, mutatva a protontranszport hiányát

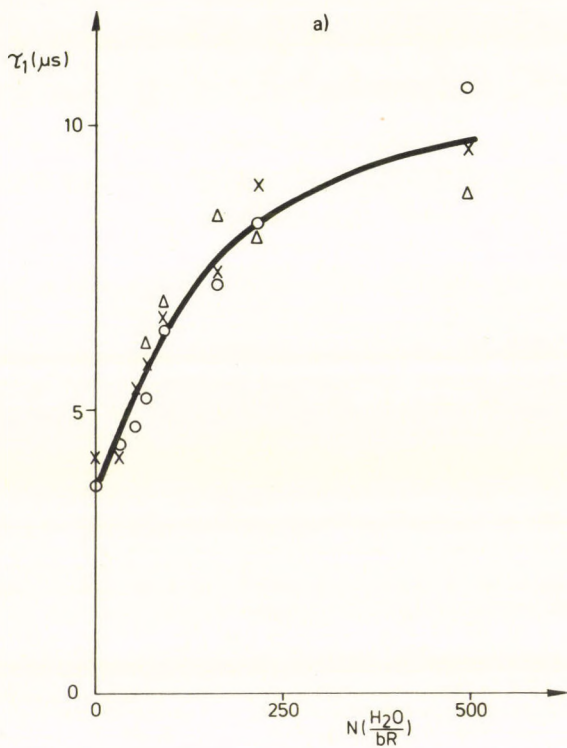
negatív jel területének ( $S_3$ ) és a pozitív jel területének ( $S_2$ ) arányát adjuk meg a minta relatív nedvességének függvényében.  $S_2$  jellemzi az  $L \rightarrow M$  átmenet,  $S_3$  az  $M \rightarrow bR$  átmenet területét, amely arányos az elmozdulással. Minthogy  $[d_4 - (d_1 + d_2 + d_3)]/d_4 =$

$=0,7$ ,  $S_3/S_2$  abszolút értékére  $0,7$ -et várunk. A mért értékek átlaga  $P/P_0 \leq 0,51$  esetekben ezzel jó egyezésben van. Állíthatjuk tehát, hogy száraz mintákban a protonok az  $M$  állapotból az alapállapotba térnek vissza, nincs érintkezés a külvilággal, nincs valódi protontranszlokáció. A negatív jelet és a hozzátartozó abszorpció jelet  $M \rightarrow bR$  átmenethez rendeljük. Nagyobb víztartalomnál megindul a protontranszlokáció, ezért  $|S_3/S_2|$  csökken.

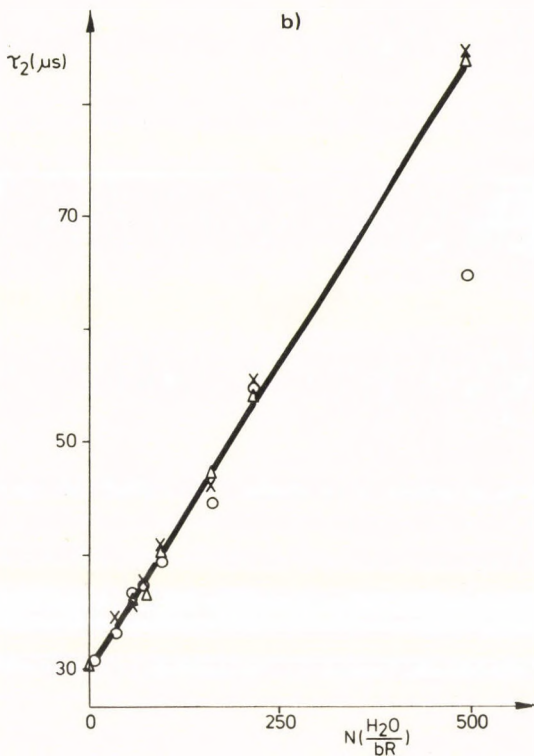
c) A két jól mérhető elektromos és abszorpció jele ( $L \rightarrow M$ ,  $M \rightarrow bR$ ) bomlásgörbéje látszólag két exponenciális görbével írható le. Az időállandók szoros korrelációban vannak. A 39. ábrán bemutatjuk az  $L \rightarrow M$  átmenet két időállandójának függését a relatív nedvességtartalomtól. A belső átmenetek időállandója a relatív nedvességtartalommal együtt csökken, míg az  $M \rightarrow bR$  átmenet időállandója nő.

A fentiekből a legfontosabbnak a b) pontot tartjuk, amely azt jelenti, hogy vízmolekulák hiányában a külső átmenetek nem valósulnak meg. A külső átmenetek megvalósulásához vízmolekulák bőséges jelenléte kell. Szuszpenzióban  $d_5/[d_4 - (d_1 + d_2 + d_3)] = 9$ , amiből azt következtetjük, hogy a vízmolekulák közvetlenül is részt vesznek a „proton vezetésben” a külső átmenetek esetében. A belső átmenetek esetében a vízmolekulák csak az időállandókat változtatják.

Ez a megfigyelés tette lehetővé egy egyszerű protonvezetési mechanizmus kidolgozását, amely nem igényli az oldalláncok speciális struktúráját, és összhangban van a fehérjékre vonatkozó általános ismeretekkel. A fehérjét alkotó atomok fluktuá-





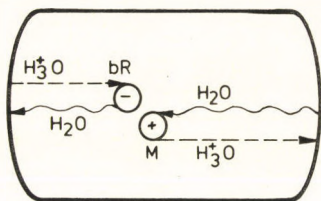


**39. ábra. a, b)** Az  $L-M$  átmenet időállandói a relatív nedvességtartalom függvényében (ezt a  $\text{H}_2\text{O}/\text{bR}$  molekulák  $N$  hányadosára számítottuk át). Elektromos jelek ( $\circ$ ), abszorpciós jelek  $\lambda = 400$  nm-en ( $\times$ ) és  $\lambda = 525$  nm-en ( $\Delta$ ). A korreláció nagyon jó

ciója következtében a fehérjék részeit a vízmolekulák könnyen elérhetik [83, 84]. Az egyes részek között a fluktuációk következtében kisebb üregek képződhetnek, amelyeknek a felületről bejárataik lehetnek. Az üregek, a bejáratok folytonosan mozognak, de a változások viszonylag gyorsak. Egyes helyeket a vízmolekulák ms alatt is elérnek, ahogy azt a peptid hidrogének H—D kicserélődésének vizsgálatai mutatják [85]. Mármost feltesszük, hogy az *M* állapotban az *L* → *M* átmenet során protonálódott COOH-csoport csak akkor képes deprotonálódni, ha egy vízmolekula átveszi a protont,  $\text{H}_3^+\text{O}$  hidroxoniumiont formálva. Az *M* bomlás barrierje nagyon nagy a deprotonálódásra, ha vízmolekula nincs a környezetben. Ekkor a proton belső mozgásának nagyon kicsi valószínűsége lesz a folyamat vezérlője.

Amikor a vízmolekula átveszi a protont, a molekula belsejében még mindig van elektromos tér, amely a  $\text{H}_3^+\text{O}$ -iont kihajtja a felületre. A negatív töltés, amely kompenzálatlan most a belső oldalról egy  $\text{H}_3^+\text{O}$ -ion közvetítette töltést vonz, és így helyreáll a bR alapállapota. A viszonyokat a 40. ábrán modellezzük.

A kísérletek a mai technikai színvonalon a vízmolekula vezető modell javára sem tudnak dönteni, tehát ezt is csupán lehetőségként tarthatjuk számon. A modell előnyére szól, hogy a fehérjék általános, fluktuációs tulajdonságaira épül, nem igényel speciális oldallánc szerkezetet (egy szerkezeti követelmény azonban itt is van: a Schiff-bázis protonját kompenzáló töltés csak befelé nyitott, a

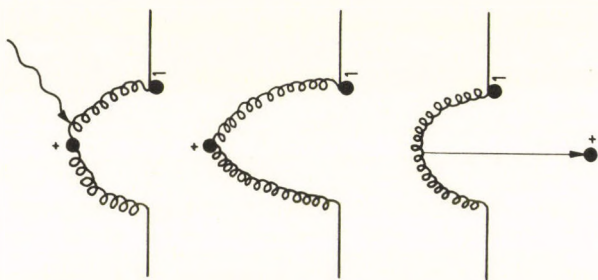


**40. ábra.** A protonvezetés alternatív modellje. A protonokat vízmolekulák veszik fel, és a  $\text{H}_3\text{O}^+$ -ionok mozognak a belső elektromos terekben

$\text{COO}^-$ -csoport pedig csak kívülről közelíthető meg  $\text{H}_2\text{O}$ -molekulákkal, a fehérje belsejében egy „vízváltót” kell feltételeznünk) és általánosítható más ionokra (pl.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  stb.) is, ami a H-kötött láncok esetén nem lehetséges.

## 5. A PUMPÁK MŰKÖDÉSE

A bR-molekula az abszorbeált foton hatására egy protont pumpál át a membrán egyik oldaláról a másikra. Az elvégzett kísérletek és azok értelmezése módot nyújtott a protonpumpa részletesebb modelljének a kidolgozására, amely azonban még további megerősítésre szorul. Ezt legfőképpen a bR-molekula 3-dimenziós szerkezetének a megismerésétől várjuk. Felmerül azonban a kérdés, hogy a pumpák „modell molekuláján” ez ideig megszerzett ismeretek nyújtanak-e lehetőséget további általánosításra, más pumpák működésének megértésére, találunk-e útmutatást további kísérletek elvégzésére? A válaszuk pozitív.



41. ábra. A bR protonpumpa „csúzli”-modellje

Fordítsuk figyelmünket a bR-pumpa energetikájára. Láttuk, hogy a fotonenergia a Schiff-bázison levő protont egy negatív töltéstől eltávolította, az energia átalakult elektrosztatikus energiává. A proton az első töltésmozgással *ellentétes* irányban lép ki. A 41. ábrán bemutatjuk, hogy az első kis mozgások a pumpát mintegy „felhúzták”, és a további lépésekben a proton a negatív töltés vonzásának hatására a negatív töltés mellett messzire elrepült. A rövid távú felhúzás, messzire elrepítés a „csúzli”-ra emlékeztet, ahol is a kavicsot a csúzli-gumi rugalmas ereje ellenében kicsit hátrahúzzuk és elengedve az messzire repül.

Az irodalomban közölt néhány eredményt figyelmesen szemlélve a „csúzli-effektus”-t más esetekben is felismerhetjük. SKULACHEV és munkatársai a szem retinájának elektromos jelenségeit tanulmányozták. A retinákban a bR-molekulához hasonló rodopszin-molekulák találhatók, amelyben szintén *retinál* a fényérzékeny molekula. Flash gerjesztésre a szemrodopszin is a bR-hez hasonlóan, de időállandókban,

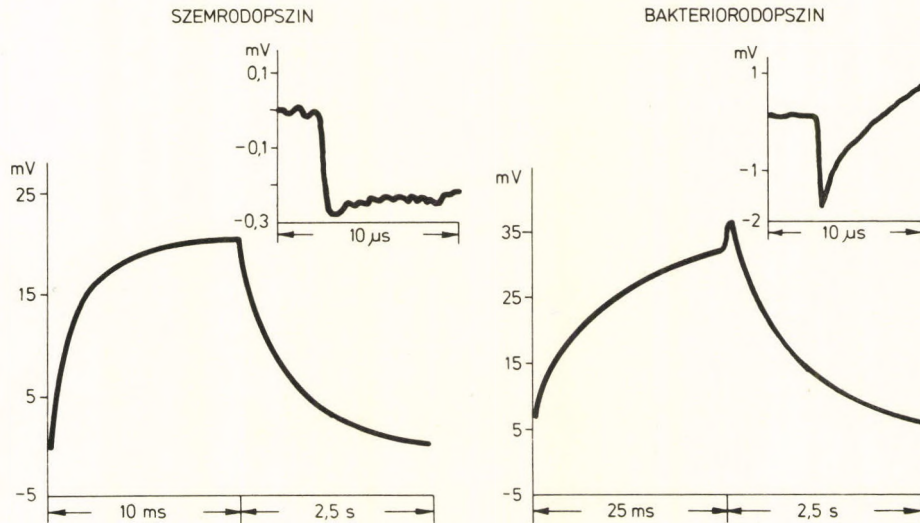


színképben különböző változásokon megy át. A színképváltozásokkal együtt töltésmozgás is történik, amelynek a szemidegek ingerlésében van eddig még nem pontosan ismert szerepe. A vizsgálatokat a bR-rel párhuzamosan végezték. A pm-eket és a retinát membránra vitték fel, amely két vizes fázist választott szét. A módszert már ismertettük (12. ábra). Az eredményeket a 42. ábrán mutatjuk be. Jól látható, hogy flash gerjesztésre mindkét esetben töltésmozgás történik, potenciál épül fel, amelyet megelőz egy kis amplitúdójú negatív jel. A „csúzli-effektus” a szemrodopszin esetében is regisztrálható.

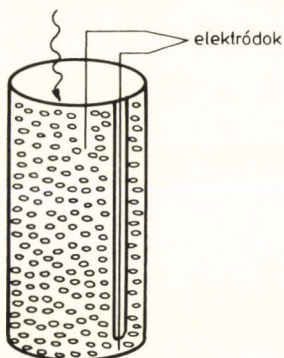
A 2. részben említettük, hogy az abszorbeált fényenergia a kloroplasztiszokon is elektromos jelenségeket indukál: a felépülő membránpotenciál közbülső energiátároló rendszer. Az elektromos jeleket az ún. fény-gradiens módszerrel lehet kimutatni [87], amelyet a 43. ábrán magyarázunk meg. TRISSL et al. [88] ns fényimpulzussal gerjesztve a 44. ábrán látható elektromos jelet kapta. A negatív jelet itt is pozitív jel követi.

A *Thiocapsa persicina* fotoszintetizáló baktérium. A klorofillmolekulák a sejt membránjában helyezkednek el. A fénygradiens módszer segítségével sikerült elektromos jeleket mérni, amelyet a 45. ábrán mutatunk be. A jelek megdöböntő módon hasonlítanak a pm-en mért jelekhez.

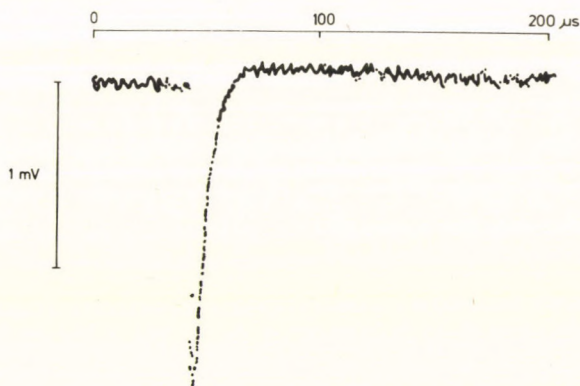
Állíthatjuk, hogy a bR-rel együtt, a felsorolt fotongerjesztéssel működő 4 pumparendszerben is megnyilvánul a „csúzli-effektus”. Ezután kérdezhetjük, várhatunk-e hasonló jelenségeket az ATP által működtetett pumpák (1. táblázat) esetében?



**42. ábra.** Elektromos jelek összehasonlítása szem- és bakteriorodopszin esetében



**43. ábra.** A fénygradiens módszer. A szuszpenzióban lebegő zárt gömböcskék fény felé eső oldalán  $\sim 1\%$  foton abszorbeálódik, amely már hiányzik a másik oldalra jutó fényből. A membrán merőleges irányába ható elektromos folyamatok tehát nem kompenzálódnak tökéletesen. A fény irányában elhelyezett elektrodok elektromos jeleket mérnek

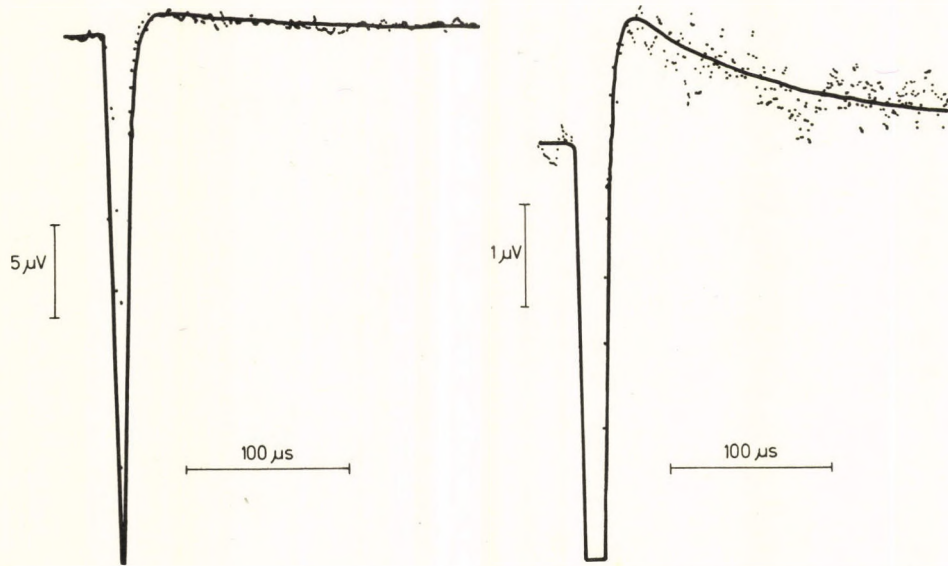


**44. ábra.** A fénygradiens módszerrel kloroplasztiszokon mért elektromos jelek

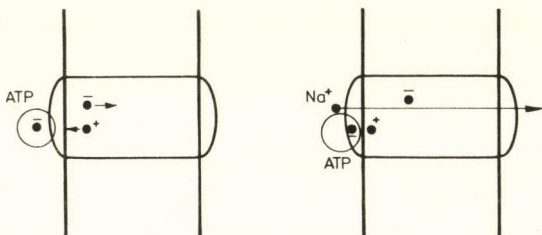
Ezekről a pumpákról biztosan tudjuk, hogy a töltés transzlokáció energiaszükségletét az ATP fedezi. A pumpák ATP hasítás nélkül nem működnek. Semmi sem ismeretes azonban — más ATP igényes folyamatoknál sem —, hogy a felszabaduló energia milyen módon alakul át az ionokat mozgató energiává. A „csúzli-effektus” alapján az ATP pumpákra egyszerű modell dolgozható ki. A modellt a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -ázra konkretizáljuk. Ismeretes [2], hogy a pumpa először a  $3\text{Na}^+$ -iont helyezi át, tulajdonképpen ez az energiaigényes folyamat. Tehát a  $\text{Na}^+$ -ionok pumpálását próbáljuk megérteni.

Az ATP-nek oldatban 4 negatív töltése van, amelyből kettőt az ATP-áz-hoz való kötődést elősegítő  $\text{Mg}^{2+}$ -ionok lekötnek. Tehát az ATP  $\text{Mg}^{2+}$  kötésekor az ATP-áz belső felületén, ahonnan a  $\text{Na}^+$ -ionokat át kell pumpálni, két negatív töltés jelenik meg, amely valamely kikompenzált pozitív és negatív töltéspár távolságát megváltoztatja, mert a pozitív töltést maga felé vonzza. A kötéskor felszabaduló energia itt is elektrosztatikus energiává alakul át, ehhez kis elmozdulások szükségesek (46. ábra). A kezdetben jól kompenzált negatív töltés kompenzálatlanná válik, és az oldatban található  $\text{Na}^+$ -ionokat átrántja a külső oldalra. A modell jóslata a következő: az Mg-ATP molekula egyszerű diffúzióval jut el a kötési helyre, ekkor elektromos jel nem mérhető. A kötés pillanatában az ATP-ázban levő pozitív oldallánc 0,1—0,2 nm-t elmozdul a belső oldal felé. Az elektromos jel első komponense itt is ellentétes





45. ábra. A fénygradiens módszerrel *Thiocapsa persicina* fotoszintetizáló baktériumon mért elektromos jelek



46. ábra. A  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -áz működésének energetikai modellje

előjelű, mint a  $\text{Na}^+$ -ionmozgásnak megfelelő elektromos jel.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -áz molekulákat mintegy 70%-ban tartalmazó membrán darabkákat sikerült Jörgensen módszerével [89] előállítanunk (disznó-veséből). A „vese-membrán” fragmentumokat elektromos térrel sikerült szuszpenzióban orientálni is, tehát biztosan nem zárt gömbök, mert akkor nem lenne permanens dipólnyomatékuk. A modell alapján várható elektromos jel kimutatására további kísérletek szükségesek.

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Itt szeretném köszönetemet kifejezni azoknak a fiatal munkatársaimnak, akik a dolgozatban felsorolt munkákban részt vettek és a kísérletek értelmezésében, a modellek kidolgozásában sok segítséget nyújtottak. Dancsházy Zsolt vezette be a baktériorodopszin kutatásokat az SZBK Biofizikai Inté-

zetében, a vizsgálandó anyag előkészítése még mindig az ő felügyelete alatt történik. Az elektromos jelek első mérésében és értelmezésében Ormos Pálnak vannak elvülhetetlen érdemei, a fotoszelekciós mérésekben Czégé József, Zimányi László és Dér András tűntek ki, a száraz minták kidolgozása és az elvégzett mérések Váró Györgyöt dicsérik, a pm-ek orientációjának részleteit főleg Barabás Klára és Dér András tisztázták, Groma Géza és Dancsházy Zsolt hívták fel figyelmemet az elektromos tér visszahatásának jelenségére, Pósfai János a számítások kivitelezésében nyújtott segítséget, a vese-membrán szeparálása Hargittai Pál és Simon József érdeme.

A munkák a National Science Foundation és az MTA szerződése alapján kooperációban folytak az University of California at San Francisco, Medical School Prof. W. Stoeckenius vezette egyik kutatócsoportjával, valamint az University of Illinois at Urbana Physics Departmentjén dolgozó kutatócsoporttal, amelyet Prof. H. Frauenfelder és Prof. Laura Eisenstein vezet. A munkák egyes részeiben USA munkatársak is résztvettek: D. Beece, M. Marden, L. Reinisch és K. T. Yne.

## IRODALOM

1. SIMONYI K., A fizika kultúrtörténete. Gondolat, 1981, p. 284.
2. KYTE, J., *Nature*, 292 (1981) 201.
3. MITCHELL, P., *Nature*, 191 (1961) 144.
4. BOYER, P. D., CHANCE, B., ERNSTER, L., MITCHELL, P., RACKER, E. and SLATER, E. C., *Ann. Rev. of Biochemistry*, 46 (1977) 955.
5. MITCHELL, P., in *Of Oxygen, Fuels and Living Matter*, Part 1. ed. by G. Semenza, John Wiley (1981) p. 1.
6. WIKSTRÖM, M. and KRAB, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 549 (1971) 177.
7. STOECKENIUS, W., LOZIER, L. H. and BOGOMOLNI, R. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 505 (1979) 215.
8. HENDERSON, R. and UNWIN, P. N. T., *Nature*, 257 (1975) 28.
9. OVCHINNIKOV, YU. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. YU., KISELEV, A. V. and LOBANOV, N. A., *FEBS Letters*, 100 (1979) 219.
10. KHORANA, H. G., GERBER, G. E., HERLIHY, W. C., GRAY, C. P., ANDEREGG, R. J., NIHEI, K. and BIEMANN, K., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 (1979) 5046.
11. LEWIS, A., SPONHOWER, J., BOGOMOLNI, R. A., LOZIER, R. H., and STOECKENIUS, W., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71 (1974) 4462.
12. HEYN, M. P., CHERRY, R. J. and MÜLLER, U., *J. Mol. Biol.*, 117 (1977) 607.
13. KING, G. I., STOECKENIUS, W., CRESPI, H., SCHOENBORN, B. P., *J. Mol. Biol.*, 130 (1979) 395.
14. LOZIER, R. H., BOGOMOLNI, R. A. and STOECKENIUS, W., *Biophys. J.*, 15 (1975) 955.
15. NAGLE, J. F., PARODI, L. A. and LOZIER, R. H., *Biophys. J.*, 38 (1982) 161.
16. EVANS, R. D., *The Atomic Nucleus*, McGraw-Hill, New York, Toronto, London 1955. p. 470.
17. KORENSTEIN, R., HESS, B. and KUSCHMITZ, D., *FEBS Letters*, 93 (1978) 266.
18. KALISKY, O. and OTTOLENGHI, M., *Photochem. Photobiol.*, 35 (1982) 109.



19. BALASHOV, S. P. and LITVIN, F. F., *Photochem. Photobiophys.*, 2 (1981) 111.
20. AUSTIN, R. H., BEESON, K. W., EISENSTEIN, L., FRAUENFELDER, H. and GUNSALUS, I. C., *Biochemistry*, 14 (1975) 5355.
21. FRAUENFELDER, H., PETSKO, G. A. and TSERNOGLU, D., *Nature*, 280 (1979) 558.
22. SHINNER, J. L. and WOLYNES, P., *J. Chem. Phys.*, 69 (1978) 2143.
23. BEECE, D., BRAWNE, S. F., CZÉGÉ, J., EISENSTEIN, L., FRAUENFELDER, H., GOOD, D., MARDEN, M. C., MARQUE, J., ORMOS, P., REINISCH, L. and YUE, K. T., *Photochem. Photobiol.*, 33 (1981) 517.
24. GOLDANSKII, V. I., *Nature*, 279 (1979) 109.
25. LAVOREL, J. and DENNERY, J. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 680 (1982) 281.
26. FARINEAU, J., GARAB, GY., HORVÁTH, G. and FALUDI-DÁNIEL, Á., *FEBS Letters*, 118 (1980) 119.
27. ARMSTRONG, C. M. and GILLY, W. F., *J. Gen. Physiol.*, 74 (1979) 691.
28. BOGOMOLNI, R. A., STUBBS, L. and LÁNYI, J. K., *Biochemistry*, 17 (1978) 1037.
29. BECHER, B., KOKUNAGA, F. and EBREY, T. G., *Biochemistry*, 17 (1978) 2293.
30. HESS, B. and KUSCHMITZ, D., *FEBS Letters*, 100 (1979) 334.
31. KUSCHMITZ, D. and HESS, B., *FEBS Letters*, 138 (1982) 137.
32. CZÉGÉ, J., DÉR, A., ZIMÁNYI, L. and KESZTHELYI, L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 (1982) 7273.
33. PETTEL, M. J., YUDD, A. P., NAKANISHI, K., HENSELMAN, R. and STOECKENIUS, W., *Biochemistry* 16 (1977) 1955.
34. BAGLEY, K., DOLLINGER, G., EISENSTEIN, L., SINGH, A. K. and ZIMÁNYI, L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 (1982) 4972.
35. BRAIMAN, M. and MATHIES, R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 (1982) 403.
36. EISENSTEIN, LAURA, private communication
37. BECHER, B. and EBREY, T. G., *Biophys. J.*, 17 (1977) 185.
38. OESTERHELT, D. and HESS, B., *Eur. J. Biochem.*, 37 (1973) 316.
39. HARTMANN, R., STICKINGER, H. D. and OESTERHELT, D., *FEBS Letters*, 82 (1977) 1

40. DRACHEV, L. A., JASAITIS, A. A., KAULEN, A. D., KONDRASHIN, A. A., LIBERMANN, E. A., NEMECEK, I. B., OSTROUNOV, S. A., SEMIONOV, A. YU. and SKULACHEV, V. P., *Nature*, 249 (1974) 321.
41. RACKER, E. and STOECKENIUS, W., *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 662.
42. STOECKENIUS, W., LOZIER, R. H. and BOGOMOLNI, R. A. in *Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. by SKULACHEV, V. P. and HINKLE, P. C., ADDISON-WESLEY, 1981. p. 283.
43. ORT, D. R. and PARSON, W. W., *Biophys. J.*, 25 (1979) 341.
44. GOVINDJEE, R., EBREY, T. G. and CROFTS, A. R., *Biophys. J.*, 30 (1980) 321.
45. GOVINDJEE, R., OHNO, K. and EBREY, T. G., *Biophys. J.*, 38 (1982) 85.
46. ORMOS, P., Kandidátusi értekezés, 1982.
47. KUSCHMITZ, D. and HESS, B., *Biochemistry USA*, 20 (1981) 5950.
48. BOGOMOLNI, R. A., BAKER, R. A., LOZIER, R. H. and STOECKENIUS, W., *Biochemistry*, 19 (1980) 2152.
49. TRISSL, H. W. and MONTAL, M., *Nature*, 266 (1977) 655.
50. HONG, F. T. and MONTAL, M., *Biophys. J.*, 25 (1979) 465.
51. DRACHEV, L. A., KAULEN, A. D. and SKULACHEV, V. P., *FEBS Letters*, 87 (1978) 161.
52. KESZTHELYI, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 598 (1980) 429.
53. KESZTHELYI, L., *Methods in Enzymology*, 38 (1982) 287.
54. BARABÁS, K., DÉR, A., DANCShÁZY, Zs., MARDEN, M., ORMOS, P. and KESZTHELYI, L., *Biophysical Journal*, 43 (1983) 5.
55. KESZTHELYI, L. and ORMOS, P., *FEBS Letters*, 109 (1980) 189.
56. ORMOS, P., DANCShÁZY, Zs. and KESZTHELYI, L., *Biophys. J.*, 31 (1980) 207.
57. FREDERICQUE, E. and HOUSSIER, C., *Electric Dichroism and Electric Birefringence*. Clarendon Press, Oxford (1973).
58. SHAH, M. I., *Phys. Chem.*, 67 (1963) 2215.
59. ORMOS, P., REINISCH, L. and KESZTHELYI, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 722 (1983) 471.
60. BRAIMAN, M. and MATHIES, R., *Biophys. J.* 41 (1983) 14a.
61. SIMONYI, K., *Physikalische Elektronik*, Teubner Stuttgart (1972) pp. 649—652.

62. LÄUGER, P., BENZ, R., STARK, G., BAMBERG, E., JORDAN, P. C., FAHR, A. and BROCK, V., *Quart. Rev. Biophys.*, 14 (1981) 513.
63. KESZTHELYI, L., *MTA Biol. Oszt. Közl.*, 23 (1980) 347.
64. EL-SAYED, M. A., KARVALY, B. and FUKUMOTO, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78 (1982) 2686.
65. PACKER, L., SCHERRER, P., YNE, K. T., VÁRÓ, GY., ORMOS, P., BARABÁS, K., DÉR, A. and KESZTHELYI, L., *Biochemistry International*, 5 (1982) 437.
66. KELLER, H., and DEBRUNNER, P. S., *Phys. Rev. Letters*, 45 (1980) 68.
67. TAKANO, T. and DICKERSON, R. E., *J. Mol. Biol.*, 153 (1981) 95.
68. HONIG, B., EBREY, T., CALLENDER, R., DINUR, U. and OTTOLENGHI, M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 (1979) 2503.
69. KARVALY, B. and DANCShÁZY, Zs., *FEBS Letters*, 76 (1977) 36.
70. DANCShÁZY, Zs., DRACHEV, L. A., ORMOS, P., NAGY, K. and SKULACHEV, V. P., *FEBS Letters*, 96 (1978) 59.
71. STOECKENIUS, W. in *Membrane Transduction Mechanisms* ed. by CONE, R. A. and DOWLING, J. E. (Raven, New York) 1979, p. 39.
72. HSIEH, CH.-L., NAGUMO, M., NICOL, M. and EL-SAYED, M. A., *J. Phys. Chem.*, 85 (1981) 2714.
73. WARSHEL, A., *Photochem. Photobiol.*, 30 (1979) 285.
74. SCHULTEN, K. and TAWAN, P., *Nature*, 272 (1978) 85.
75. SCHULTEN, K. in *Energetics and Structure of Halophylic Microorganisms*, ed. by CAPLAN, S. R. and GINZBURG, M. (Elsevier, 1978) pp. 331.
76. ORLANDI, G. and SCHULTEN, K., *Chem. Phys. Lett.*, 64 (1979) 370.
77. NAGLE, J. F., MILLE, M., and MOROWITZ, H. J., *J. Chem. Phys.*, 72 (1979) 3959.
78. NAGLE, J. F. and MILLE, M., *J. Chem. Phys.*, 74 (1981) 1367.
79. KESZTHELYI, L. and ORMOS, P., *Biophysical Chemistry*, 18 (1983) 397.
80. KESZTHELYI, L., ORMOS, P. and VÁRÓ, GY., *Acta Phys. Hung.*, 53 (1982) 143.
81. VÁRÓ, GY. and KESZTHELYI, L., *Biophysical J.*, 43 (1983) 47.
82. VÁRÓ, GY., *Acta Biologica Acad. Sci. Hung.*, 32 (1982) 301.
83. RICHARDS, F. M., *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.*, 6 (1977) 151.



84. RICHARDS, F. M., Abstracts of the VII. International Biophys. Congress, Mexico City, 1981. p. 14.
85. ROSE, J., J. Mol. Biol., 113 (1979) 143.
86. BOLSHAKOV, V. I., DRACHEV, A. L., DRACHEV, L. A., KALAMKAROV, G. R., KAULEN, A. D., OSTROVSKII, M. A. and SKULACHEV, V. P., Dokl. Akad. Nauk, USSR, 259 (1979) 1462.
87. FOWLER, CH.-F. and KOK, B., Biochim. Biophys. Acta, 357 (1974) 308.
88. TRISSL, H. W., KUNZE, U. and JUNGE, W., Biochim. Biophys. Acta, 682, 3 (1982) 364.
89. JORGENSEN, P. L., Quart. Rev. Biophys. 7 (1975) 239.



A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó és Nyomda főigazgatója

Felelős szerkesztő: Nagy Tibor

A tipográfia és a köttésterv Löblin Judit munkája

Műszaki szerkesztő: Érdi Júlia

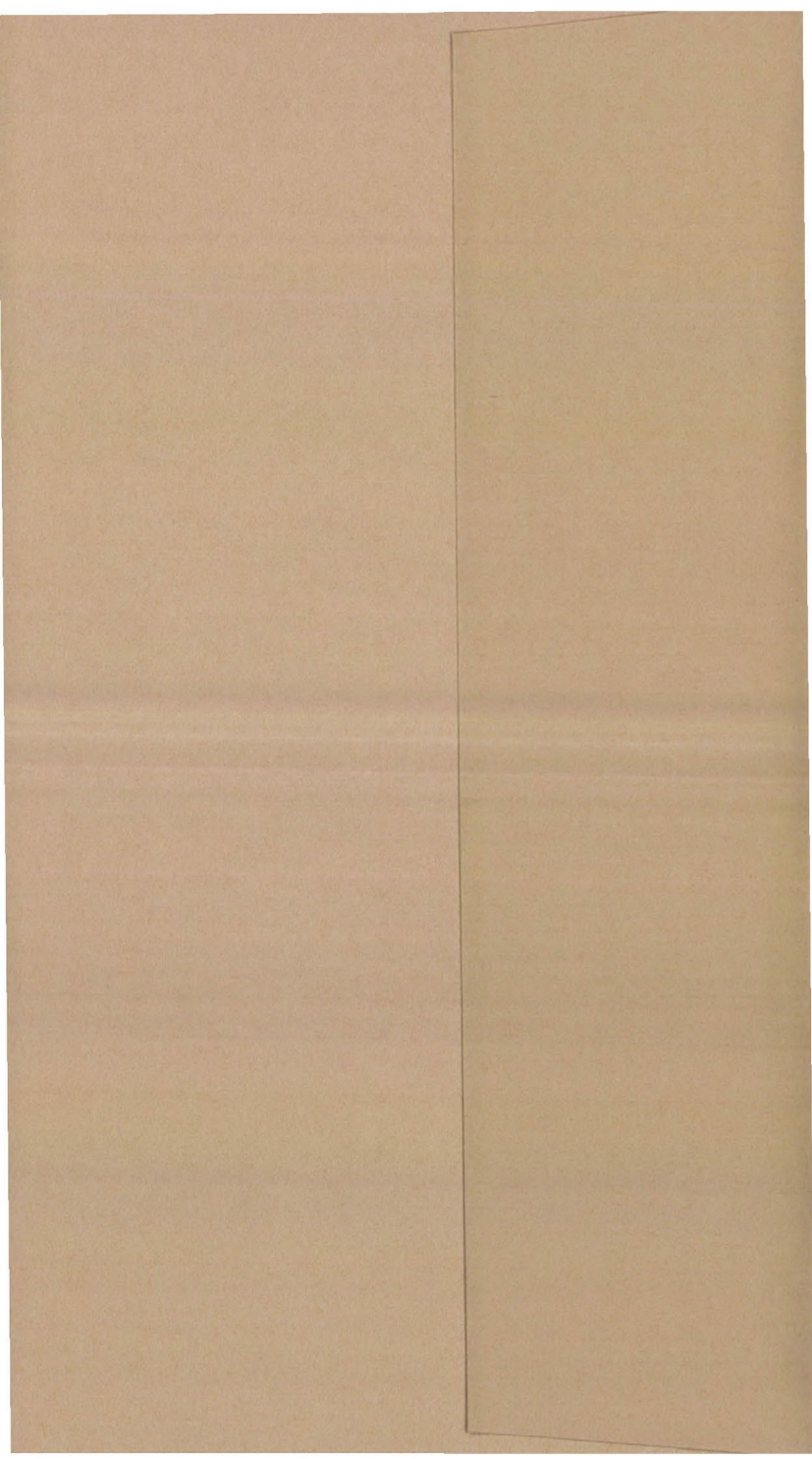
Terjedelem: 5,73 (A/5) ív — AK 1712 k 8587

HU ISSN 0236—6258

13445 Akadémiai Kiadó és Nyomda

Felelős vezető: Hazai György





Ára: 31, - Ft